ZUR REGULATION DER GENAKTIVITÄT UND GENEXPRESSION AN POLYTÄNEN RIESENCHROMOSOMEN DER SPEICHELDRÜSEN VON DROSOPHILA MELANOGASTER

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Hans Jürgen Behnel
aus Hameln

Göttingen 1976

ZUR REGULATION DER GENAKTIVITÄT UND GENEXPRESSION AN POLYTÄNEN RIESENCHROMOSOMEN DER SPEICHELDRÜSEN VON DROSOPHILA MELANOGASTER

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Hans Jürgen Behnel
aus Hameln

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. L. Rensing
Korreferent: Prof. Dr. G. Birtkow

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 11.1976

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Erklärung der Abkürzungen	
1.	Einleitung	1
2.	Methodik	6
2.1.	Material	
	2.1.1. Zucht und Haltung der Fliegenlarven	
	2.1.2. Zusammensetzung des Kulturmediums	
2.2.	Untersuchung des Puffmusters der Riesenchromosomen	8
	2.2.1. Isolierung und Inkubation der Speicheldrüsen	
	2.2.2. Präparation und Färbung der Chromosomen	
	2.2.3. Messung und Berechnung des Puffquotienten	
2.3.	Bestimmung der Enzymaktivitäten	9
	2.3.1. Herstellung von Drüsenhomogenaten	10
	2.3.2. Bestimmung der Malat-Dehydrogenase-Aktivität	
	2.3.3. Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität	11
	2.3.4. Bestimmung der Pyruvat-Kinase-Aktivität	12
	2.3.5. Berechnung der Aktivitätsparameter V_{max} und K_m nach der Regressionsgeraden	13

3. Ergebnisse 15

3.1. Induktionsverhalten der hitzespezifischen Puffs

3.1.1. Beschreibung der Chromosomenregion 2R/ 54 BC 15

3.1.2. Puffrepression durch exogenes ATP über die mitochondriale ATPase 18

3.1.3. Puffrepression durch exogenes Substrat des Krebs-Zyklus 21

3.1.4. Test von Metaboliten der Glycolyse auf die Puffinduktion durch Trinactin 24

3.1.5. Puffinduktion unter Blockierung der ATP-Translokase und der Elektronentransportkette 26

3.1.6. Wirkung von Cycloheximid auf die Puffregression nach Induktion durch Anaerobiose 28

3.2. Änderung von Enzymaktivitäten in Speicheldrüsenzellen infolge Hitzepuffinduktion 32

3.2.1. Die Pyruvat-Kinase-Aktivität 34

3.2.2. Induktion der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität 34

3.2.3. Induktion der Malat-Dehydrogenase-Aktivität 38

3.2.4. Vergleich der Kinetiken von Puffinduktion und Enzyminduktion nach Anaerobiose 43

4. Diskussion 47

4.1. Ein hypothetisches Modell für den Kontroll- 61
mechanismus der Genaktivität in den Hitzepuffs
der Speicheldrüsenkerne von Drosophila-Larven

5. Zusammenfassung 65

6. Literaturverzeichnis 68

Erklärung der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
DNP	2-,4-Dinitrophenol
K_m	Michaeliskonstante
LDH	Lactat-Dehydrogenase
sMDH	lösliche Malat-Dehydrogenase
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
OAA	Oxalacetat
PQ	Puffquotient
Py	Pyruvat
U	Enzym-Aktivitätseinheit (1 µM/ min)
V_{max}	Maximale Enzym-Reaktionsgeschwindigkeit
e_{340}	Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm
2/ 54 BC	Region 54 BC auf dem zweiten Chromosom
3SE	Dreifacher Standardfehler
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvat-Kinase

1. Einleitung

Für das Phänomen der Zelldifferenzierung ist sicherlich eine der wichtigsten Voraussetzungen die selektive Regulation der Genaktivität. Dies bedeutet, daß für jeden einzelnen Differenzierungsgrad eine bestimmte Gruppe von Genen aktiv, während eine andere Gruppe inaktiv sein muß.
Diese Vorstellung hat sich festigen können aus der Tatsache, daß jede Zelle eines differenzierten Organismus ein identisches Genom enthält; und Unterstützung fand dieses Konzept aus dem Nachweis, daß der größere Teil des Genoms in höheren Zellen inaktiv vorliegt, und daß in verschiedenen differenzierten Zelltypen verschiedene Ribonukleinsäuren synthetisiert werden.
Über die regulatorischen Mechanismen bei der Genexpression in Eukaryoten bestehen bisher keine genauen Vorstellungen und inwieweit sich die Grundprinzipien der positiven und negativen Kontrolle der Genaktivität, wie sie bei Bakterien und Viren weigehend bekannt sind, im Verlauf der Evolution erhalten haben, ist noch ungewiß.
Eine besondere Methode zur Untersuchung der Regulation von genetischer Aktivität wurde an polytänen Chromosomen entwickelt, wie sie in verschiedenen Geweben von Dipterenlarven vorkommen, weitgehendst aber an Speicheldrüsen studiert wurden.
Diese Chromosomen, die durch wiederholte Replikation des normalen diploiden somatischen Chromosomensatzes entstehen unter Ausfall der Chromatidentrennung und Kernteilung, stellen Bündel von 1000 bis 4000 parallelen DNA-Protein-

Fibrillen dar, deren homologe Chromomeren eng miteinander gepaart vorliegen. Aus der exakten Aneinanderlagerung zahlreicher Chromomeren ergibt sich mikroskopisch das charakteristische Querscheibenmuster der polytänen Chromosomen. Dabei wechseln sich Banden und Interbanden nacheinander ab, die sich unterschiedlich stark anfärben lassen aufgrund verschiedenen DNA-Gehaltes und verschiedener struktureller Dichte.

Im mikroskopischen Präparat liegt das polytäne Chromosom in charakteristisch gepufftem Zustand vor, was bedeutet, daß die einzelnen Banden unterschiedlich starke Verdickungen aufweisen. Feinstrukturanalysen von BEERMANN und BAHR (1954) ergaben, daß es sich bei den Puffs um Chromosomenabschnitte handelt, in denen die eng gepackte DNA der Fibrillen gestreckt werden kann und so der RNA-Polymerase zugänglich ist.

Funktionell erwiesen sich die Puffs als transskriptionsaktive Chromosomenorte. Dies zeigt sich einmal darin, daß gepuffte Regionen gegenüber ungepufften RNA-spezifische Färbung erkennen lassen, zum anderen ergaben autoradiographische Untersuchungen durch Präinkubation von Speicheldrüsen mit ^{3}H-Uridin ein Markierungsmuster, das dem Puffmuster der Chromosomen entspricht, wobei der Grad des Einbaues markierten Uridins mit der relativen Puffgröße korreliert ist (PELLING, 1964; ZHIMALEV und BELGAEVA, 1975; NAGEL und RENSING, 1974).

BEERMANN (1964) zeigte, daß Actinomycin die Puffbildung hemmt und sogar eine Regression bewirkt. Jeder Puff entspricht daher einem Ort verstärkter RNA-Synthese, wobei die Puffgröße ein Maß für die RNA-Syntheseaktivität angibt.

Seit den Untersuchungen von BEERMANN (1964), ELLGAARD und CLEVER (1971) und ASHBURNER (1972) ist es sicher, daß die Puffbildung von der RNA-Synthese eines Amanitin-sensibelen Enzyms abhängig ist. Actinomycin, Amanitin und Cordycepin hemmen die Entwicklung von Puffs. Amanitin hemmt dabei die Inkorporation von ^{3}H-Uridin in den Puffs von Chironomus-Speicheldrüsenkernen nicht aber die nukleolare RNA-Synthese (BEERMANN 1971), ein Analogon zu Säugetierzellen.

Das Puffmuster ist charakteristisch für verschiedene Gewebe und variiert innerhalb eines Gewebes mit fortschreitender Entwicklung (BEERMANN 1952). Detaillierte Untersuchungen über den Wechsel des Puffmusters in Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila melanogaster während des letzten Larvenstadiums wurden von ASHBURNER (1967, 1969, 1974) durchgeführt.

Sowohl durch Injektion des Häutungshormons Ecdyson in Larven als auch durch Behandlung isolierter Speicheldrüsen mit diesem Hormon konnte gezeigt werden, daß der Wechsel des Puffmusters keiner strengen Programmierung unterliegt, sondern offensichtlich unter direkter regulatorischer Kontrolle des jeweiligen entwicklungsphysiologischen Zustands des Organismus und der Zellen steht.
CLEVER und KARLSON (1960) hatten erstmals zeigen können, daß der normale entwicklungsabhängige Wechsel des Puffmusters künstlich durch Injektion von Ecdyson in die Larven eingeleitet werden kann. Dabei bewirkt das Hormon wahrscheinlich in Verbindung mit spezifischen Hormonrezeptoren eine direkte Steuerung der Genaktivität.

Eine biphasische Induktionssequenz erkannte ASHBURNER (1972), wenn isolierte Speicheldrüsen mit Ecdyson in Kultur gebracht wurden. Das entwicklungsmäßige Aufeinanderfolgen von Gruppen aktivierter Puffs scheint auf eine Initialinduktion weniger "early puffs" durch Ecdyson zurückgeführt zu werden, deren Genprodukte regulatorisch auf andere Genorte,"late puffs", weiterwirken.

Generell kann für die polytänen Chromosomen angenommen werden, daß aufgrund des charakteristischen Puffing bestimmter Banden eine Bande die Einheit der Genexpression darstellt.

Neben diesen entwicklungsspezifischen Puffs, die die Mehrzahl aktivierbarer Chromosomenorte bilden, ist eine kleinere Gruppe von Puffs bekannt, die kein deutliches entwicklungsspezifisches Aktivitätsmuster aufweist, sondern die anscheinend mit dem atmungsphysiologischen Zustand der Zelle korreliert ist. Die Induktion dieser Puffs konnte erstmals gezeigt werden durch Erhöhung der Temperatur in den Larven oder isolierten Speicheldrüsen von 25° auf 37°C (RITOSSA 1963). Ferner zeigte sich eine Induzierbarkeit dieser Puffs durch Behandlung isolierter Drüsen mit Inhibitoren der mitochondrialen Funktionen unabhängig vom herrschenden Entwicklungsgrad der Zellen.
So tritt die Induktion von neun bisher bekannten hitzespezifischen Puffs ein durch Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, durch Hitzeschock, Inhibitoren der Atmungskette, und nach Beendigung einer anaerobiotischen Behandlung (RITOSSA 1963, 1964; ASHBURNER 1970; ELLGAARD und CLEVER 1971; ELLGAARD 1972; LEENDERS und BERENDES 1972; RENSING 1973; BEHNEL und RENSING 1975). Sie ist nicht beschränkt

auf die Speicheldrüsen sondern läßt sich in verschiedenen Geweben finden an identischen Chromosomenorten.(RITOSSA 1964).

Da die oben erwähnte Induktion der Hitzepuffs in vielen Fällen durch exogenes ATP im Kulturmedium unterdrückt werden kann, liegt die Vermutung nahe, daß die Aktivität dieser Puffs mit dem atmungsphysiologischen Zustand der Zelle, eventuell sogar mit dem Phosphorylierungspotential der Mitochondrien gekoppelt ist (LEENDERS und BERENDES 1972; BEHNEL und RENSING 1975), daß die Blockierung des Energiemetabolismus gefolgt von spezifischer Geninduktion eine Art Kompensation einleitet (LEENDERS et al. 1974; BERENDES 1972).

Tatsächlich konnten LEENDERS und BECKERS (1972) bereits zeigen, daß infolge einer Hitzepuffinduktion die Gesamtaktivität der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase ansteigt und diese Steigerung auf Proteinneosynthese beruht.

Obwohl die Kernmembran höherer Organismen befähigt ist zur Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung, besteht doch genügend Grund anzunehmen, daß die Kontrolle der Hitzepuffaktivität über plasmatische Faktoren erfolgt (LEENDERS et al 1972; BERENDES 1972).

Diese Voraussetzungen bieten die Arbeitshypothese für die vorliegende Arbeit, in der versucht wurde, die Kopplungsstellen zwischen mitochondrialer Aktivität und Genaktivität näher einzugrenzen und Aussagen über die Bedeutung der Induktion von Hitzepuffs für den Zellstoffwechsel zu machen. Dazu wird ein Modell diskutiert für den Kontrollmechanismus der atmungsspezifischen Puffinduktion.

2. Methodik

2.1. Material

2.1.1. Zucht und Haltung der Fliegenlarven

Alle Experimente wurden durchgeführt mit isolierten Speicheldrüsen aus Larven des dritten Entwicklungsstadiums von Drosophila melanogaster Meigen. Die Larven wurden bei 25°C im Licht-Dunkel-Wechsel 12:12 Stunden auf einem Kulturbrei gezüchtet, wie er bei RENSING (1966) näher beschrieben ist. Die Auswahl der zur Untersuchung dienenden Larven wurde nach dem Migrationsverhalten getroffen,so daß nur Larven der späten Migrationsphase von etwa 120 Stunden nach Eiablage benutzt wurden (RENSING et al. 1972).

2.1.2. Zusammensetzung des Kulturmediums

Die Isolierung und Kultivierung der Speicheldrüsen erfolgte in einem definierten Kulturmedium (NM), das von RENSING (1969) entwickelt wurde und in modifizierter Form (RENSING et al. 1975) verwendet wurde.
Die Zusammensetzung ist in Tabelle 1. aufgeführt. Die organischen Verbindungen wurden zusammen in 116 ml destillierten Wasser gelöst, die anorganischen Salze einzeln in Lösung gegeben. Der pH des Mediums wurde anschließend mit 2N KOH auf 6,7 - 6,8 eingestellt.

Tabelle 1. Zusammensetzung des Kulturmediums für isolierte Speicheldrüsen von Drosophila melanogaster.

Saccharose	50 mg	Valin	22 mg
Glucose	50	Alanin	48
Trehalose	500	Glycin	57
Ascorbinsäure	10	Threonin	36
-Ketoglutarat	35	Lysin	180
Pyruvat	6	Arginin	44
Glutamat	70	Histidin	70
Aspartat	20	Asparagin	35
Fumarat	6	Glutamin	180
Edamin	200	Serin	50
Hefeextrakt	70	Penicillin	12
		Streptomycin	20
Tyrosin	15	$Na_2H\ PO_4$	107
Methionin	21	KCl	260
Cystein	10	$CaCl_2$	116
Tryptophan	10	$MgSO_4$ $(7H_2O)$	186
Prolin	48	$MgCl_2$ $(6H_2O)$	336
Leucin	10	Natriumcitrat $(2H_2O)$	341

Testsubstanzen wurden dem Kulturmedium jeweils in Lösung gegeben, wasserunlösliche Substanzen vorher in 96% Äthanol gelöst, wobei die Äthanolkonzentration im Kulturmedium auf 1% verdünnt wurde.

Das Medium wurde als Vorrat bei -20°C aufbewahrt und kurz vor Gebrauch aufgetaut, steril filtriert und mit Carbogen versetzt. Die Inkubationstemperatur des Mediums betrug in allen Versuchen 25°C, wenn nicht anders angegeben.

2.2. Untersuchung des Puffmusters der Riesenchromosomen.

2.2.1. Isolierung und Inkubation der Speicheldrüsen

Alle Speicheldrüsen wurden in wenigen Tropfen Medium unterm Binokular aus den Larven isoliert und mittels einer Präpariernadel in das fertige Inkubationsmedium übertragen. Die Inkubation selbst erfolgte in einigen Tropfen Medium (modifiziert wie jeweilig angegeben) auf einem Objektträger innerhalb eines aufgeschmolzenen Wachsringes.

2.2.2. Präparation und Färbung der Chromosomen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Drüsen in einem Tropfen 50% Essigsäure für 1 Minute fixiert und anschließend auf einen neuen Objektträger in 1 bis 2 Tropfen Farblösung für 3 Minuten übertragen. Die Farblösung setzte sich zusammen aus 1% Orcein in 90% Milchsäure und 100% Eisessig,zu gleichen Teilen gelöst. Anschließend wurden die gefärbten Drüsen unter einem Deckglas gequetscht und die überflüssige Farblösung abgesaugt. Der Quetschvorgang wurde unterm Binokular beobachtet, damit die Chromosomen möglichst ohne Zerrungen gestreckt wurden.

2.2.3. Messung und Berechnung des Puffquotienten.

Die Messung der Puffgröße, d.h. der größte Durchmesser einer untersuchten Bande erfolgte unterm Phasen-Kontrast-Mikroskop im grünen Durchlicht und mir Hilfe einer Kamera-lucida. Die relative Puffgröße, der Puffquotient (PQ) errechnet sich aus dem Verhältnis des

Durchmessers der gepufften Region zu dem einer nicht gepufften Bande (Abb. 1.). Die gemittelten PQ-Werte wurden aus 10 bis 20 Einzelwerten errechnet unter Angabe des dreifachen Standardfehlers.

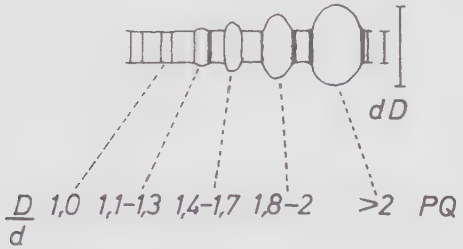


Abb. 1. Skala der Puffgrößenbestimmung (nach ZHIMULEV)

2.3. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde die Extinktionsänderung von NADH bei 340 nm und 25°C in 1 ml-Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke entweder im einfachen oder im gekoppelten Test photometrisch gemessen, alle 10 sec registriert und gegen die Zeit graphisch aufgetragen.

Die Initialgeschwindigkeit der Reaktion wurde geometrisch bestimmt durch Anlegen der Tangente in dem steilen linearen Bereich der Reaktionsgeschwindigkeitskurve und auf den Gesamtproteingehalt des Drüsenhomogenats bezogen.

Der Proteingehalt wurde mit Folin-Ciocalteus-Reagenz nach LOWRY (1951) bestimmt.

Die relative Aktivität der Enzyme wurde berechnet nach der Gleichung:

$$A = \frac{\Delta E \times V_{ges} \times 1000}{min \times V_{Ext} \times e_{340} \times Prot_{ges}}$$

und in der Einheit mU/ µg Protein ausgedrückt.

2.3.1. Herstellung von Drüsenhomogenaten

Die Messung der Enzymaktivitäten in Speicheldrüsen wurde mit Drüsenhomogenaten durchgeführt. Die Menge der pro Test benötigten Drüsen hing ab von der jeweiligen absoluten Aktivität des Enzyms im Extrakt. Für die MDH-Bestimmung genügten 10 bis 20 Drüsen, während für die LDH- und PK-Bestimmung etwa 50 Drüsen erforderlich waren.

Zur Herstellung des Homogenats wurden die Drüsen kurz in eiskaltem Puffer mit Hilfe eines Glashomogenisators zerrieben. Das Rohhomogenat wurde dann durch Zentrifugieren für 10 Minuten bei 15000 U/ min und 4°C von Zelltrümmern und Organellen befreit. Der Überstand mit den löslichen Proteinen diente zum Test und wurde bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt.

2.3.2. Bestimmung der Malat-Dehydrogenase-Aktivität.

Bei der MDH-Bestimmung wurden die Drüsen in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 homogenisiert. Bei diesem

pH erfolgte auch die Messung der Aktivität. Dazu diente folgender Meßansatz:

0,90 ml Drüsenextrakt (V_{Ext})
0,05 ml NADH 3,3 mM
0,05 ml Oxalacetat

1,00 ml Gesamtvolumen (V_{ges})

Der Test wurde mit fünf verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt, wobei die Endkonzentration jeweils 0,01 mM, 0,02 mM, 0,04 mM, 0,05 mM und 0,1 mM betrug. Das Oxalacetat und das NADH wurden im selben Puffer gelöst.
ATP wurde, wenn angegeben als 0,1 ml 10 mM Pufferlösung in den Test gegeben, wobei dann das Extraktvolumen 0,80 ml betrug.

2.3.3. Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität.

Zur LDH-Bestimmung wurden die Drüsen in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,5 homogenisiert. Pyruvat und NADH wurden im selben Puffer gelöst.
Der Meßansatz bestand aus:

0,90 ml Drüsenextrakt
0,05 ml NADH 3,3 mM
0,05 ml Pyruvatlösung

1,00 ml Gesamtvolumen

Die Pyruvatkonzentrationen betrugen jeweils: 0,05 mM, 0,10 mM, 0,20 mM, 0,50 mM und 1,0 mM.

2.3.4. Bestimmung der Pyruvat-Kinase-Aktivität.

Zur Messung der PK-Aktivität mußte zuvor das pH-Optimum bestimmt werden. Dazu wurde die Aktivität ein und desselben Extraktes bei verschiedenen pH-Werten des Phosphatpuffers bestimmt. Wie aus Abb. 2. hervorgeht, liegt das pH-Optimum in 0,1 M Phosphatpuffer zwischen 6,3 und 6,5. Daher wurden alle weiteren Messungen bei pH 6,4 ausgeführt.

Die Drüsenhomogenisierung erfolgte in demselben Puffer wie die Lösung von NADH und ADP. Phosphorenolpyruvat (PEP) wurde in 0,5 M $MgSO_4$ und 2 M KCl-Lösung gelöst.

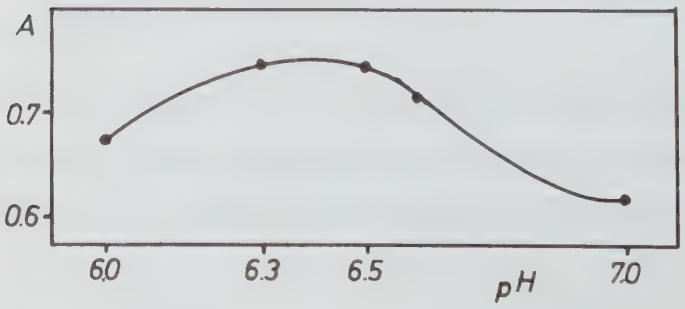
Der Testansatz bestand aus:

0,850 ml Drüsenextrakt
0,05 ml NADH 3,3 mM
0,05 ml ADP 20 mM
0,05 ml PEP
0,001 ml LDH-Enzymsuspension (Boehringer)

1,001 ml Gesamtvolumen

Die PEP-Endkonzentrationen waren: 0,01 mM, 0,02 mM , 0,05 mM und 0,1 mM.

Abb. 2. Aktivität der PK in Abhängigkeit vom pH.



2.3.5. Berechnung der Aktivitätsparameter V_{max} und K_m.

Um die Auswirkung etwaiger Fehler bei der Substratkonzentration auf die Berechnung der Enzymaktivität auszuschalten, wurden alle Tests bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und die Michaeliskonstante K_m berechnet nach der Lineweaver-Burk-Beziehung:

$$v^{-1} = \frac{K_m}{V_{max}} s^{-1} + V_{max}^{-1} \qquad \text{(Gleichung 1.)}$$

Die Gleichung der Reaktionskinetik wurde umgedeutet in die Regressionsgerade:

$$v^{-1} = b \cdot s^{-1} + a \qquad \text{(Gleichung 2.)}$$

wobei der Regressionskoeffizient

$$b_{s;v} = \frac{\Sigma(s_i^{-1} - s_m^{-1})(v_i^{-1} - v_m^{-1})}{\Sigma(s_i^{-1} - s_m^{-1})^2} \qquad \text{(Gleichung 3.)}$$

die Steigung der Geraden $b = \frac{K_m}{V_{max}}$ angibt. (Gleichung 4.

s_i^{-1} und v_i^{-1} sind die Kehrwerte der jeweiligen Substratkonzentration s_i und der bei ihr gemessenen Aktivität v_i.

$s_m^{-1} = \frac{\sum s_i^{-1}}{n}$ und $v_m^{-1} = \frac{\sum v_i^{-1}}{n}$ bilden den Mittelpunkt der Regressionsstrecke zwischen $(s_1^{-1}; v_1^{-1})$ und $(s_n^{-1}; v_n^{-1})$.

Aus Gleichung 1. und 4. ergibt sich für V_{max}

$$V_{max} = (v_m^{-1} - b \cdot s_m^{-1})^{-1} \quad \text{(Gleichung 5.).}$$

Für K_m gilt, weil $b = \frac{K_m}{V_{max}}$,

$$K_m = \frac{b}{v_m^{-1} - b \cdot s_m^{-1}} \quad \text{(Gleichung 6.).}$$

Aus den Gleichungen 5. und 6. wurden V_{max} und K_m nach jedem Test berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Induktionsverhalten der hitzespezifischen Puffs.

Seit den Untersuchungen von RITOSSA (1962.1963,1964). ASHBURNER (1970), ELLGAARD und CLEVER (1972), ELLGAARD (1972), LEENDERS und BERENDES (1972) und aus eigener Arbeit (BEHNEL und RENSING 1975) ist es bekannt, daß die hitzespezifischen Puffs induzierbar sind durch Behandlung der Speicheldrüsen mit Entkopplern (2-4-DNP) Ionophore (Valinomycin und Trinactin), durch Inhibitoren der Atmungskette (Rotenon, Amytal, Antimycin, Na-Azid und KCN) und durch den Inhibitor der endständigen ADP-Phosphorylierung Oligomycin. Außerdem bewirkt Sauerstoffzufuhr nach anaerobiotischer Behandlung die spezifische Induktion dieser Puffs.

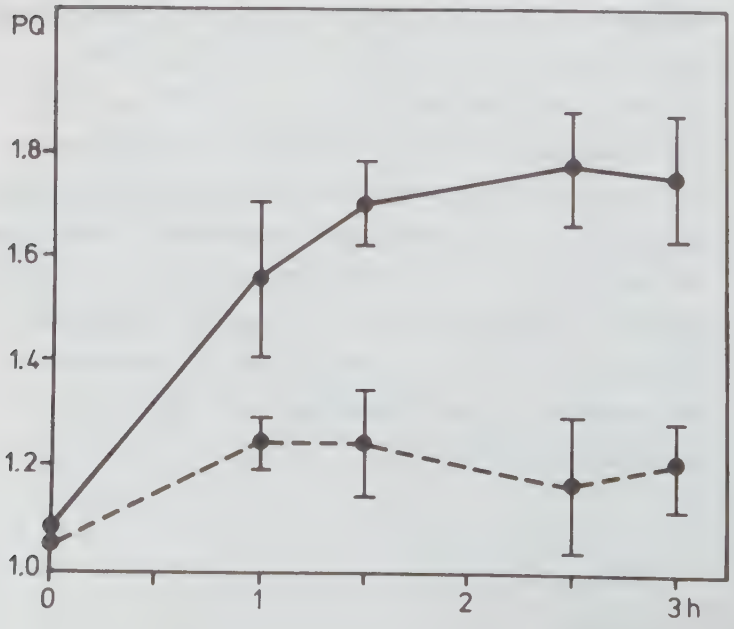
3.1.1. Beschreibung der Chromosomenregion 2R/ 54 BC.

ASHBURNER (1970, 1972) beschrieb die neun bisher bekannten hitzespezifischen Puffs: 2L/ 33B; 2R/ 48E; 3L/ 63BC, 64F, 67B; und 3R/ 87A, 87BC, 93D und 95D. der Riesenchromosomen von Drosophila melanogaster. Zur detaillierten Beschreibung des Induktionsverhaltens dieser Puffs nach Einwirkung verschiedener Inhibitoren des Stoffwechsels soll vorweg eine in diesem Zusammenhang noch nicht beschriebene Region erörtert werden. Die Region 54 BC auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms zeigt eine Eigenschaft, die denen der Hitzepuffs analog ist.

Nach Inkubation der Drüsen mit 1 µM Trinactin im Kulturmedium zeigt die Region 54 BC ein signifikantes Puffing, das mit zunehmender Inkubationszeit größer wird und nach etwa zweieinhalb Stunden ein Maximum erreicht. Danach verharrt die Region im gepufften Zustand wie es für die Trinactininduktion charakteristisch ist. In eigenen Experimenten konnte die Persistenz der Puffs bei Trinactininkubation über sechs Stunden beobachtet werden. Nach längerer Inkubationszeit begann ein Großteil der Zellen abzusterben. Abb. 3. zeigt den Zeitverlauf des Puffing in 54 BC bei Trinactininduktion.

Abb. 3. Induktion des Puff 54 BC durch Trinactin (1µM) nach in vitro Inkubation der Speicheldrüsen. Behandelte Drüsen ——; unbehandelte Drüsen ------.

Ordinate: Puffquotient (PQ)
Abszisse: Inkubationszeit in Stunden.



Danach ist eine leichte Induktion des Puffs ebenfalls zu beobachten, wenn die Drüsen in NM isoliert und eine Stunde inkubiert werden. Diese Erscheinung ist seinerzeit bei NAGEL und RENSING (1971) bei der Beschreibung des Puffmusters nach Isolierung der Speicheldrüsen in künstlichem Kulturmedium erwähnt worden. In dieser Arbeit wurde die Region mit 53 CD bezeichnet, sie ist aber mit der hier beschriebenen Region 54 BC identisch. Weitere Induktionen des 54BC ergaben sich nach Behandlung der Drüsen mit Temperaturschock für 8 Minuten und mit Valinomycin (Tabelle 2.). Zur Kontrolle wurden die Inkubationsexperimente wiederholt bei einem anderen Stamm von Drosophila melanogaster, bei dem die Ergebnisse bestätigt werden konnten.

Tabelle 2. Puffgröße der Region 54 BC nach Hitzeschock, Valinomycin- Behandlung und exogenem ATP.

Behandlung	PQ	3SE
8 min. 25°C	1,11	(0,06)
8 min. 37°C	1,67	(0,14)
60 min. Val. 1 µM	1,55	(0,16)
60 min. Val. 1 µM + ATP 1 µM	1,10	(0,11)

Diese Befunde und vor allem die Hemmbarkeit der Puffbildung durch exogenes ATP lassen vermuten, daß die Region 54 BC gleiche regulatorische Eigenschaften besitzt wie die übrigen Hitzepuffs. Aus diesem Grund wird der 54 BC in den weiteren Untersuchungen neben den Hitzepuffs mitaufgeführt

3.1.2. Puffrepression durch exogenes ATP über die mitochondriale ATPase.

Während die Versorgung der Zellen mit exogenem ATP bei der Temperaturschock-Induktion die Puffinduktion verzögern kann (LEENDER et al.1972), ist die Induktion mit Entkopplern nach den vorliegenden Ergebnissen mit exogenem ATP vollständig zu hemmen, das heißt, in eigenen Untersuchungen (BEHNEL,RENSING 1975) wurde während dreistündiger Inkubation mit Trinactin und ATP keinerlei Puffinduktion festgestellt, wobei der zelluläre ATP-Spiegel ebenfalls keine wesentliche Veränderung erfuhr.

Dagegen zeigt die Blockierung der oxidativen Phosphorylierung durch Oligomycin eine spezifische Puffinduktion, die jedoch durch exogenes ATP nicht beeinflußt wird. Diese Induktion durch Oligomycin konnte von LEENDERS und BERENDES (1972) nicht festgestellt werden, was eventuell auf nicht wirksame Konzentrationen zurückgeführt werden kann, da hier eine deutliche Dosisabhängigkeit vorliegt (BEHNEL, RENSING 1975). Die experimentellen Daten hierfür gibt die Tabelle 3. wieder.

Tabelle 3. Änderung der Puffgröße nach zwei Stunden Inkubation der Speicheldrüsen in Kombinationen von ATP mit Trinactin (1 µM), Valinomycin (1 µM) und Oligomycin (50 µM).

Behandlung	63BC	67 B	87 A	87BC	93 D	54 BC	33 B
NM	1,00	1,13	1,00	1,00	1,41	1,18	1,12
Trinactin	1,92	2,25	2,44	2,59	2,35	1,72	1,54
Trinactin + ATP(1mM)	1,09	1,06	1,12	1,12	1,36	1,08	1,11
Valinomycin	1,88	1,98	2,20	2,11	2,55	1,64	1,58
Valinomycin + ATP(1mM)	1,09	1,19	1,18	1,39	1,45	1,17	1,19
Oligomycin	1,76	1,92	2,29	2,55	2,10	1,52	1,16
Oligomycin + ATP(1mM)	1,68	1,89	1,89	2,24	1,88	1,46	1,68

Die Fehler der einzelnen Werte liegen zwischen 5%, maximal 11%.

Darüber hinaus vermag die Wirkung von Oligomycin in selbst nicht induzierender Konzentration von 10^{-6}M die Hemmung der trinactininduzierten Puffbildung durch ATP zu verhindern. Dieser Effekt ist wohl mit Sicherheit nicht auf eine Hemmung der Na-K-abhängigen ATPase zurückzuführen, da mit Ouabain die gleiche Wirkung nicht erzielt werden kann. Vielmehr ist die Ursache des Oligomycin-Effektes in der Hemmung der intramitochondrialen ATP-Synthetase zu vermuten, durch die die Hydrolysierungs-

energie von ATP auf die Energieüberträger des oxidativen Phosphorylierungssystems übertragen werden kann unter Umkehr der normalen Energieflußrichtung. Diese Vermutung wird gestützt von der Tatsache, daß der Effekt von Oligomycin gleicherweise erzielt werden kann durch die Hemmung des Transports von ATP in die mitochondriale Matrix durch Atractylosid. Atractylosid, das selbst ebenfalls in einer Konzentration von 10^{-4}M keine Puffinduktion bewirken kann, hemmt kompetitiv den äußeren Bindungsort der Adeninnukleotid-Translokase in der inneren Mitochondrienmembran. (HELDT 1969). Während Oligomycin die intramitochondriale Verfügbarkeit von der ATP-Hydrolysierungsenergie durch Blockierung der ATPase-Aktivität hemmt, wird die von Atractylosid durch Blockierung der Translokation gehemmt. Beide Inhibitoren bewirken hinsichtlich der Puffrepression durch ATP denselben Effekt (Tabelle 4.).

Tabelle 4. Wirkung von Atractylosid und Oligomycin auf die Änderung der Puffgröße bei der Behandlung der Drüsen mit Trinactin und ATP.

Behandlung		63BC	67B	93D	87A	87BC	54BC
Atractylosid	(10^{-4}M)	0,98	1,00	1,32	1,02	1,27	1,09
Oligomycin	(10^{-6}M)	1,00	1,00	1,55	1,05	1,12	1,10
Trinactin	(10^{-6}M)	1,75	1,98	2,02	2,32	1,96	1,71
+ ATP	(10^{-3}M)						
+ Oligomycin	(10^{-6}M)						
Trinactin	(10^{-6}M)	1,88	2,18	2,36	2,34	2,59	1,61
+ ATP	(10^{-3}M)						
+ Atractylosid	(10^{-4}M)						

3.1.3. Puffrepression durch exogene Substrate des Krebs-Zyklus.

Neben der Hemmung der Hitzepuffinduktion mit Hilfe von exogenem ATP unter der Voraussetzung, daß die ATPase oder die Adeninnukleotid-Translokation nicht durch Oligomycin beziehungsweise durch Atractylosid blockiert wird, besteht eine zweite Möglichkeit, nämlich durch exogene Zufuhr von mitochondrialen Metaboliten die Puffinduktion zu hemmen oder zu verzögern. Diese Hemmung durch Malat und Succinat geht aus den Daten der Tabelle 5. hervor.

Tabelle 5. Wirkung von Malat und Succinat auf die Trinactininduktion nach zwei Stunden. Die Werte geben den Puffquotienten wieder.

Behandlung	63BC	64F	67B	87A	87BC	93D	95D
Trinactin (1µM)	1,97	1,62	2,18	2,34	2,59	2,57	1,65
Trinactin (1µM) + Malat (2mM)	1,79	1,47	1,70	2,07	2,43	1,83	1,60
Trinactin (1µM) + Succinat (2mM)	1,67	1,55	1,92	2,28	2,13	1,64	1,60
Trinactin (1µM) + Malat (1mM) + Succinat (1mM)	1,36	1,17	1,42	1,37	1,62	1,32	1,42

Der dreifache Standardfehler der einzelnen Werte liegt unter 10%.

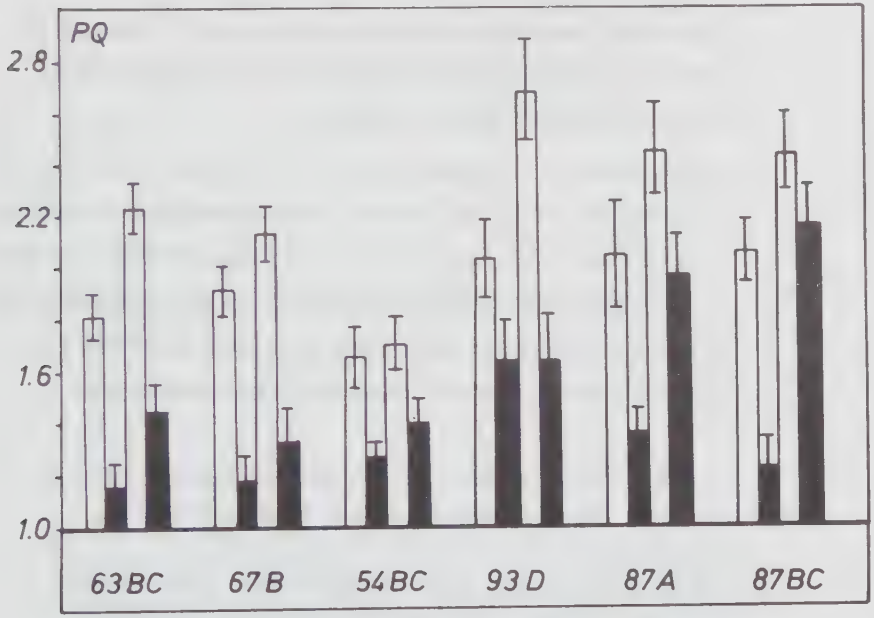
Na-Succinat und Na-Malat, beides Metaboliten des mitochondrialen Krebs-Zyklus, bewirken im Inkubationsmedium eine Verringerung der Puffinduktion mit Trinactin. Dabei ist die Wirkung von Succinat und Malat einzeln geringer als in Kombination. Dieser Befund stimmt mit denen von LEENDERS et al. (1972) an Drosophila hydei überein, wobei gleichzeitig gefunden wurde, daß die DNP-stimulierte Atmungsaktivierung durch die Kombination von Succinat und Malat in der Konzentration von jeweils 10mM zusätzlich gesteigert werden konnte.

Die Verfügbarkeit von oxidierbarem Substrat führt wohl unter Beschleunigung der Citrat-Zyklus-Reaktionen einerseits zu einer stärkeren Reduktion des intramitochondrialen NAD, andererseits zu einer höheren Produktion von Nukleotidtriphosphat via Substratphosphorylierung über die Succinyl-CoA-Synthetase. Dies setzt zwar die Zulieferung von Acetyl-CoA voraus, die aber wahrscheinlich gewährleistet ist, da das Inkubationsmedium genügend Zucker enthält, der zu Acetyl-CoA oxidiert werden kann.

Stärker in seiner Effektivität hinsichtlich der Puffrepression erweist sich das Angebot von Oxalacetat, ebenfalls ein Metabolit des Krebs-Zyklus.

Mit 2mM Oxalacetat im Inkubationsmedium wird die Puffinduktion durch Trinactin während der ersten Inkubationsstunde fast völlig gehemmt. Erst nach zwei Stunden läßt sich eine steigende Puffinduktion beobachten(Abb.4.).

Abb. 4. Der Effekt von Oxalacetat (2mM) auf die Induktion verschiedener Hitzepuffs von Drosophila Speicheldrüsenchromosomen in vitro.



Schwarze Säulen: Puffquotient nach Trinactininduktion (1 µM) zusammen mit Oxalacetat.
Weiße Säulen: Puffquotient nach Trinactininduktion.
Linke Säulen: nach einer Stunde Inkubation.
Rechte Säulen: nach zwei Stunden Inkubation.
Der PQ ist mit 3SE angegeben.

Die stärkere Wirkung von gleicher Konzentration Oxalacetat gegenüber Malat kann möglicherweise auf die Funktion des OAAs als Wasserstoffakzeptor im cytoplasmatischen Raum zurückgeführt werden, wobei aus der Glycolyse generiertes NADH über den Malat-Oxalacetat-Shuttle mitochondrial reoxidiert und der Glycolyse wieder zugeführt werden kann.

Abschließend zu diesem Versuch soll erwähnt werden, daß Asparaginsäure allein keinen Einfluß auf die Puffinduktion bewirkt und die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase etwa 1/4 der sMDH-Aktivität in den Speicheldrüsen besitzt. Ergebnisse über eine mögliche Änderung der AAT nach Puffinduktion liegen zur Zeit nicht vor.

3.1.4. Test von Metaboliten der Glycolyse auf die Puffinduktion durch Trinactin.

Um festzustellen, ob Metaboliten der Glycolyse die gleichen Effekte auf die Puffinduktion haben wie mitochondriale, wurden Drüsen in Trinactin-Medium inkubiert, in dem die Metaboliten: Fructose-6-Phosphat, (F6P), 3-Phosphor-Glycerinsäure (3PG), Phosphorenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (Py) jeweils gelöst waren. Wie Tabelle 6. zeigt, ist keiner dieser Stoffwechselmetaboliten von Wirksamkeit auf die Puffinduktion. Dies Ergebnis deutet mit darauf hin, daß die entscheidenden Ursachen, die zur Puffinduktion führen, eher an die mitochondrialen Funktionen gebunden sind als an cytoplasmatische.

Tabelle 6. Wirkung von glycolytischen Stoffwechselmetaboliten auf die Puffinduktion mit Trinactin nach einstündiger Behandlung.

	63BC	67B	93D	87BC	33B
Trinactin	1,68	1,98	2,05	2,20	1,52
Trinactin + F6P	1,66	1,82	2,00	2,17	1,55
Trinactin + 3PG	1,65	1,90	1,96	2,08	1,48
Trinactin + PEP	1,68	1,85	1,98	2,36	1,55
Trinactin + Py	1,65	1,86	1,97	2,20	1,50

Die Werte geben den PQ wieder; der 3SE liegt unter 10% F6P, 3PG, PEP,und Py waren in 2mM Konzentration im Medium gelöst, Trinactin-Konzentration betrug 1 µM.

3.1.5. Puffinduktion unter Blockierung der ATP-Translokation und der Elektronentransportkette.

Wie in eigener Arbeit berichtet wurde (BEHNEL,KENSING 1975), bewirkt Kalium-Cyanid eine schwache Induktion des 63 BC. Diese Induktion durch KCN ist stark konzentrationsabhängig und zeigt nach zweistündiger Inkubation optimale Wirkung bei 1 mM. Eine analoge Induzierbarkeit wurde nach LEENDERS et al. (1972) bei Drosophila hydei nicht beobachtet. In den hier vorliegenden Ergebnissen wird deutlich, daß die Induktion weiterer Hitzepuffs durch 5 mM KCN nach zwei Stunden geringer ist oder sogar völlig ausbleibt. Somit bleibt der 63 BC der einzige, der allein durch Inhibition des Elektronentransportes mit KCN signifikant,wenn auch schwach induziert wird.

Ein anderes Bild zeigt sich jedoch, wenn zusätzlich zur Hemmung des Elektronentransports- KCN hemmt die Cytochrom-a_3-Oxidase- die Adeninnukleotid-Translokase in der Mitochondrienmembran durch Atractylosid inhibiert wird. Dann nämlich tritt eine signifikante Puffinduktion in allen sechs hier gemessenen Chromosomenloci ein.
In Tabelle 7. sind sechs der induzierten Hitzepuffs beschrieben.
Aufgrund der Unwirksamkeit sowohl von KCN als auch von Atractylosid (vergl. 3.1.2.) in einer Puffinduktion ist der hier auftretende Effekt ausschließlich in der Kombination der beiden Inhibitoren zu finden. Eine in diesem

Zusammenhang interessante Beobachtung machten LEENDERS et al. (1972), daß nämlich KCN in der Kombination mit Oligomycin eine vergleichbare Induktion der Hitzepuffs bei Drosophila hydei bewirkt. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß eine Puffinduktion dann eintritt, wenn die Bildung energiereichen Intermediats des mitochondrialen Phosphorylierungssystems von keiner Seite erfolgen kann, weder über die ATP-Hydrolyse noch über die Atmungskette, wie es in den Absätzen 3.1.2. und 3.1.3. angedeutet war und in der Diskussion näher erörtert wird.

Tabelle 7. Puffgröße nach zweistündiger Inkubation der Drüsen in vitro mit KCN und der Kombination von KCN und Atractylosid.

Puff	KCN (5mM)	KCN (5mM) + Atractylosid (0,1mM)
63 BC	1,40 (0,09)	1,87 (0,15)
67 B	1,06 (0,12)	1,45 (0,12)
93 D	1,68 (0,18)	1,99 (0,10)
87 A	1,26 (1,18)	1,96 (0,13)
87 BC	1,15 (0,15)	2,12 (0,18)
54 BC	1,16 (0,10)	1,65 (0,13)

Die in Klammern angegeben Werte geben den 3SE an.

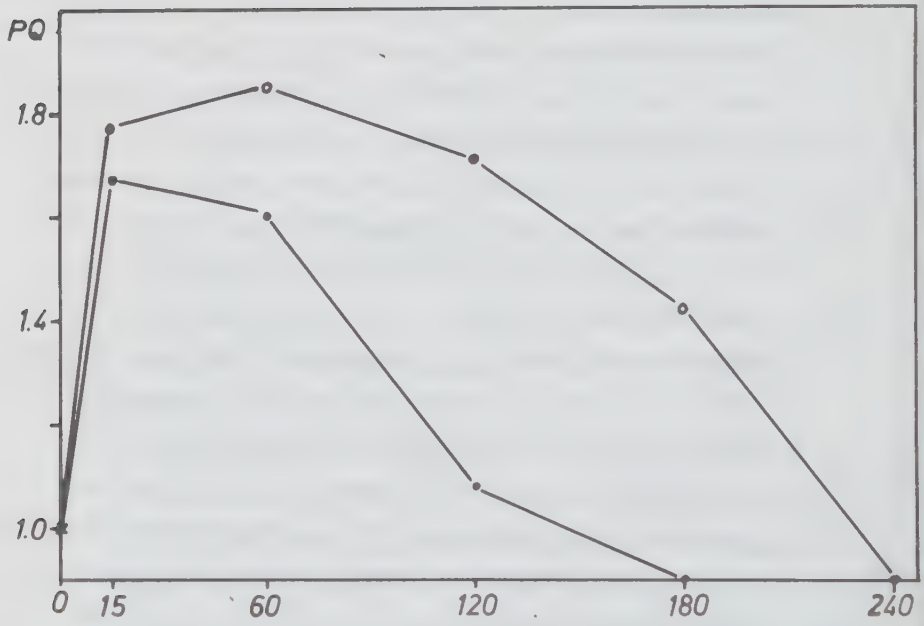
3.1.6. Wirkung von Cycloheximid auf die Puffregression nach Induktion durch Anaerobiose.

Aus Untersuchungen über die Puffregression nach Induktion durch Temperaturschock und durch O_2-Zufuhr nach Anaerobiose ist es bekannt, daß die Länge die für die Entwicklung und Zurückbildung von Puffs erforderliche Zeit abhängig ist von der Länge der Stimulationsphase. So tritt nach Beendigung einer relativ kurzen anaerobiotischen Phase von einer Stunde die Puffbildung schon nach 5 bis 10 Minuten ein und nach 40 bis 50 Minuten ist die Regression abgeschlossen. Bei längerer Inkubationszeit von drei Stunden werden 40 bis 50 Minuten für die maximale Puffinduktion benötigt und die Puffregression erfolgt erst nach 120 bis 150 Minuten.(BERENDES 1972). Eine ähnliche Abhängigkeit der Puffregressionsdauer von der Stimulationphase tritt nach Temperaturinduktion auf.

Hieraus erwächst die Forderung nach einem Mechanismus, der aufgrund der Stimulation einen "Induktor" (bisher unbekannter Natur) bereitstellt, dessen Induktionsaktivität mit wachsender Stimulationsdauer zunimmt. Daneben muß ein weiterer Mechanismus dafür sorgen, daß nach Entzug des Stimulus der "Induktor" inaktiviert wird. BERENDES (1972) spricht dabei die Vermutung aus, daß die Inaktivierung des "Induktors" eine Folge der Geninduktion sei.

Die Speicherung der Induktionsinformation während der Stimulationsphase- beispielsweise während der Anaerobiose- könnte einerseits in der Konzentrierung eines Induktors liegen, dessen Inaktivierungsdauer nach Entzug des Stimulus von seiner vorherigen Akkumulationsgröße abhängt, andererseits wäre denkbar, daß während der anaerobiotischen oder erhöhten Temperaturphase ein repressorähnlicher Komplex desintegriert, der infolge der Genaktivierung neu gebildet wird. Daß letztere Möglichkeit unwahrscheinlich ist und es sich allenfalls um ein Transskriptionsprodukt handeln kann, das an der Puffregression mitwirkt, ergibt sich aus der Tatsache, daß die Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid (50 µg/ ml) die Puffregression nicht verhindert, sondern nur verzögert.(Abb. 5.). Das hier dargestellte Verhalten des 63 BC ist repräsentativ für alle Hitzepuffs und wurde bei diesen gleichermaßen beobachtet (Tabelle 8.). Ebenso wurde nach Temperaturinduktion eine Verzögerung der Puffregression mit Cycloheximid festgestellt, wenn auch in ihrem Ausmaß weniger deutlich. Erwähnenswert scheint in diesem Zusammenhang noch zu sein, daß die Puffinduktion nicht durch Cycloheximid beeinflußt wird und so schnell eintritt, daß auf das bereits Vorhandensein eines Induktors geschlossen werden muß. Im Falle der Anaerobiose ist es denkbar, die ausbleibende Puffbildung vor der O_2-Zufuhr auf einen zu niedrigen ATP-Spiegel in den Zellen zurückzuführen, der mit der Transskriptionsrate interferiert.

Abb. 5. Verzögerung der Puffregression in der Region 63BC durch Cycloheximid nach Anaerobiose und anschließender O_2-Zufuhr.
Ganze Larven wurden 3 Stunden unter N_2 gehalten und danach die Speicheldrüsen in O_2-angereichertem NM isoliert und inkubiert.



Ordinate: Puffquotient

Abszisse: Inkubationszeit in Minuten

● Induktions-Regressionsverlauf in NM

o Induktions-Regressionsverlauf in NM + Cycloheximid (50 µg/ ml).

Tabelle 8. Verzögerung der Puffregression durch Cyclo-heximid (50 µg/ ml) nach Induktion durch Anaerobiose. (Die Bedingungen sind dieselben wie in Abb.5.).

		0	15	60	120	240 min nach O_2
67B	-	1,01	1,49	1,78	1,11	1,00
	+	1,05	1,72	1,95	1,81	1,00
93D	-	1,16	1,88	2,12	1,33	1,20
	+	1,20	2,05	2,39	2,14	1,29
87A	-	1,13	2,14	1,96	1,00	1,00
	+	1,12	2,20	2,30	2,26	1,08
87BC	-	1,10	2.32	2.02	1,09	1,00
	+	1,00	2,41	2,51	2,59	1,15
64F	-	1,00	1,26	1,58	1,10	1,00
	+	1,00	1,54	1,60	1,45	1,05
54BC	-	1,02	1,31	1,58	1,14	1,08
	+	1,04	1,47	1,57	1,56	1,12
33B	-	1,00	1,33	1,50	1,00	1,08
	+	1,00	1,48	1,54	1,50	1,11

Die Werte repräsentieren den PQ ; der relative SE liegt unter 10%.

- ohne Cycloheximid; + mit Cycloheximid.

Nach Wiederherstellung der aeroben Bedingungen wird durch gesteigerte Atmungskettenphosphorylierung ATP regeneriert, was dann zu einem raschen Beginn der Transskription führen kann.

3.2. Änderung von Enzymaktivitäten in Speicheldrüsenzellen infolge Hitzepuffinduktion.

Im Rahmen der Überlegung, es könne sich bei der Induktion der hitzespezifischen Puffs um eine Kompensation des Mangels an zellulär nutzbarer Energiegewinnung infolge der Inhibition des mitochondrialen Phosphorylierungssystems durch Entkoppler handeln, wurde die Aktivität verschiedener Enzyme getestet, denen eine besondere Rolle innerhalb des intermediären Energiestoffwechsels zukommt.

Diesbezüglich wurden die Enzyme Pyruvat-Kinase, Malat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase vor und nach Puffinduktion auf Aktivitätsänderung getestet.
Der PK kommt eine Schlüsselstellung zu bei der Überführung glycolytisch freiwerdender Energie in ATP. Zudem kann das Reaktionsprodukt der PK, Pyruvat, als mitochondrial oxidierbares Substrat der gesteigerten Atmungsaktivität zugeführt werden.
Die cytoplasmatische MDH katalysiert die Reduktion von Oxalacetat zu Malat, das ebenfalls mitochondrial veratmet werden kann. Außerdem spielt dieses Enzym

eine Rolle bei dem Transport von cytoplasmatisch gebildetem NADH in die Mitochondrien. Da die Mitochondrienmembran impermeabel für NADH ist, kann dieses nur über besondere Zyklusreaktionen in die Mitochondrien gelangen. Neben dem α-Glycerophosphat-Zyklus kommt dem Malat-Oxalacetat-Zyklus hier eine Bedeutung zu. Dabei wird cytoplasmatisches Oxalacetat zu Malat reduziert, das entweder als freie Säure oder über einen spezifischen Anionen-Carrier in die Mitochondrien gelangt und dort unter Reduktion intramitochondrialen NADs wieder zu OAA oxidiert wird.

$NADH + OAA \quad NAD^+ + Malat$: cytoplasmatische Raktion

$Malat + NAD^+ \quad OAA + NADH$: mitochondriale Reaktion

Summe: $NADH_c + NAD^+_m \quad NAD^+_c + NADH_m$

In dieser Reaktion könnte durch Erhöhung der sMDH-Aktivität der erhöhte Bedarf an mitochonrialem NADH infolge der gesteigerten Atmung durch Entkoppler gedeckt werden und gleichzeitig das im Cytoplasma gebildete NAD^+ der glycolytischen Oxidation zugeführt werden.

Die Lactat-Dehydrogenase wurde getestet, um festzustellen, ob die Lactat-Gährung in den Speicheldrüsen als Kompensation für mangelnde oxidative Phosphorylierung von Bedeutung ist.

3.2.1. Die Pyruvat-Kinase-Aktivität.

Für die Aktivitätsbestimmung dieses Enzyms mußte zuerst das pH-Optimum ermittelt werden. Dieses wurde unter 2.3.4. beschrieben und bei pH 6,4 gefunden. Ferner ergab sich bei allen Messungen eine Michaeliskonstante von K_m= 0,04. Die Aktivitäten sowohl in Drüsenextrakten ohne Behandlung als auch nach zweistündiger Inkubation in trinactinhaltigem Medium wiesen keine Unterschiede auf (Tabelle 9.).

Tabelle 9. PK-Aktivität vor und nach Puffinduktion mit 1 µM Trinactin.

Behandlung	mU/µg Prot. ± 3SE
Kontrolle	0,322 ± 0,039
2 Std. Trinactin	0,330 ± 0,030

3.2.2. Induktion der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität.

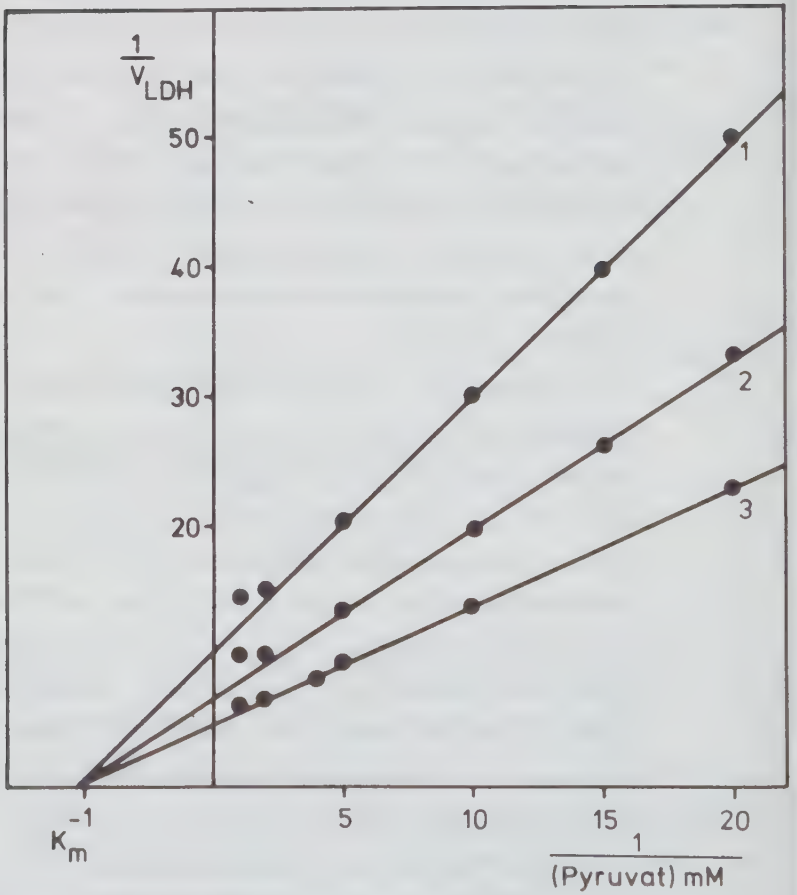
Die Lactat-Dehydrogenase ist ein cytoplasmatisches Enzym, durch dessen katalytische Aktivität die Milchsäuregärung erfolgt. Dabei wird Pyruvat als Glycolyseprodukt zu Lactat reduziert unter Regeneration von NAD^+ als Protonenakzeptor für die Oxidation des intermediären Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Dieser Reaktionsweg hat besondere Bedeutung in Säugetiergeweben bei Auftreten eines Sauerstoffmangels, existiert aber auch

in Insektengeweben außer in der Flugmuskulatur. Bei Drosophila-Larven spielt die Lactat-Gärung eine Rolle im Stoffwechsel des Puppenstadiums (RECHSTEINER 1970). Die Reduktion von Pyruvat zu Milchsäure erhält Bedeutung im Stoffwechsel, wenn die Glycolyse und Pyruvatproduktion gesteigert wird infolge einer Hemmung der Atmungskettenphosphorylierung (Pasteu-Effekt), um auf den Wege der Substratphsophorylierung weiter ATP-Synthese zu gewährleisten. Eine Steigerung der LDH-Aktivität wäre in diesem Sinne eine Kompensation bei abfallendem Phosphorylierungspotential in den Mitochondrien.

Um festzustellen, ob die Speicheldrüsenzellen von dieser Kompensationsmöglichkeit Gebrauch machen, wurde die LDH-Aktivität vor und nach Induktion der Hitzepuffs gemessen. Im kinetischen Test zeigte die LDH in der Reaktionsrichtung von Pyruvat nach Lactat eine Aktivitätsoptimum bei pH 6,5 und eine K_m bei 0,179 mM(mit einer Fehlerabweichung von 1.1% bei 1% Signifikanz.). Diese Werte decken sich gut mit denen von RECHSTEINER (1970). Außerdem wurde eine leichte Substratinhibition sichtbar bei einem Konzentrationsverhältnis oberhalb von 0,026 uM Pyruvat/ ug Protein. Bei der Aktivitätssteigerung der LDH nach Puffinduktion wird V_{max} gesteigert unter konstanter K_m (Abb. 6.).

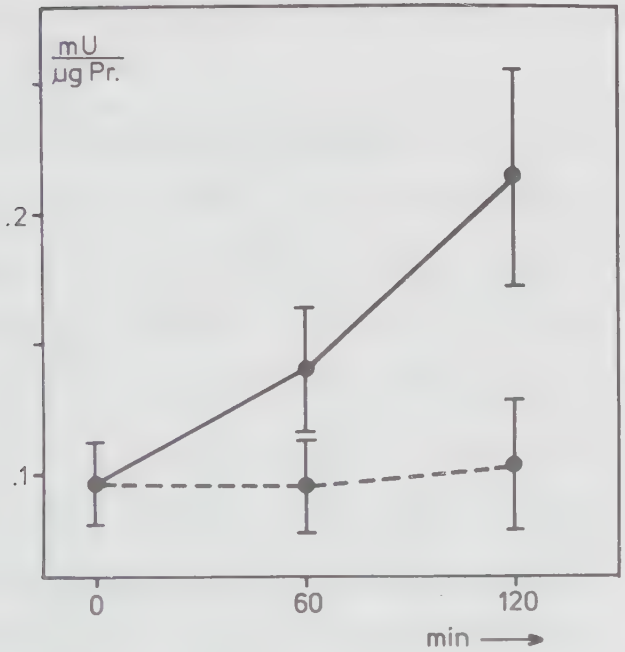
In Abb. 7. ist die relative Aktivität der LDH bezogen auf den Gesamtproteingehalt wiedergegeben nach Hitzepuffinduktion. Der Verlauf der Aktivitäts-Zeit-Kurve

Abb. 6. Kinetik der LDH von Drosophila Speicheldrüsenzellen in vitro.



Kurve 1. Kontrolle ohne Behandlung
Kurve 2. 1 Std. NM + Trinactin (1 µM)
Kurve 3. 2 Std. NM + Trinactin (1 µM)
Ordinate: $(mU/\ \mu g\ Protein)^{-1}$
Abszisse: $(mM\ Pyruvat)^{-1}$

Abb. 7. Aktivität der LDH in Speicheldrüsenzellen von Drosophila in vitro nach Induktion der Hitzepuffs mit Trinactin (1 µM) und Trinactin + Cycloheximid (50 µg/ml).



Zum Zeitpunkt 0 wurden die isolierten Drüsen in NM + Trinactin (1µM) und nach einer bzw. zwei Stunden Proben davon entnommen.

●——● mit Trinactin

●- - - -● mit Trinactin + Cycloheximid (50 µg/ml)

Ordinate: Aktivität in mU/ µg Protein

Abszisse: Inkubationszeit in Minuten

Die Werte sind mit 3SE angegeben.

in Gegenwart von Cycloheximid deutet darauf hin, daß die Steigerung der Aktivität auf Proteinneosynthese zurückgeführt werden kann. Die Inkubation der Speicheldrüsen in NM bewirkt keine Änderung der Enzymaktivität.

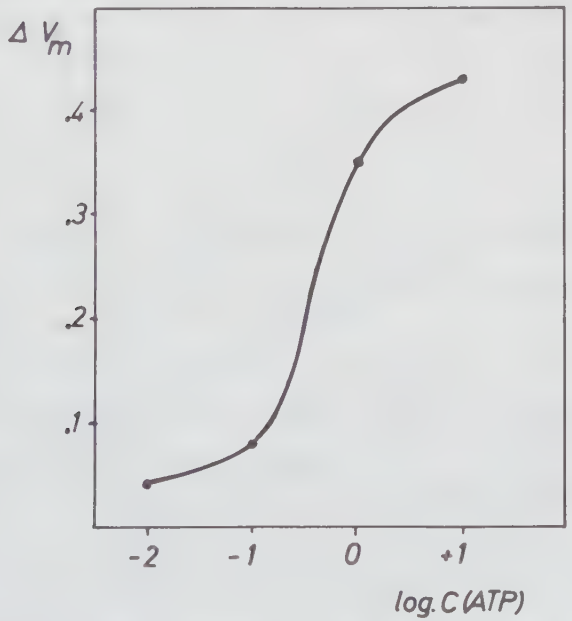
3.2.3. Induktion der Malat-Dehydrogenase-Aktivität.

Bei Drosophila sind zwei Enzyme mit MDH-Aktivität bekannt. Die eine ist in der löslichen Zellfraktion vorhanden (sMDH), die andere ist in den Mitochondrien lokalisiert (mMDH). Beide Isoenzyme sind Proteine in der Größenordnung von 68000MG und lassen sich nach ihren physikalischen und enzymatischen Eigenschaften unterscheiden (MCREYNOLDS und KITTO 1970). Die genetischen Eigenschaften der sMDH sind von O'BRIEN und MACINTYRE (1969) und von ANDERSON und GRELL (Fox 1971) untersucht worden. Aufgrund der Rekombinationshäufigkeit zweier verschiedener Allele von unterschiedlicher elektrophoretischer Eigenschaft konnte die chromosomale Position der sMDH in 2.40.1 und 2.40.2 und in 2.35.3 der Genkarte lokalisiert werden. Hybriden mit beiden Allelen in ihrem Genom zeigen ein deutliches Dreibandenmuster, was bedeutet, daß die sMDH aus zwei Proteinuntereinheiten besteht.
Hinsichtlich der Aktivitätsänderungen der sMDH nach Induktion der Hitzepuffs wurde das Enzym anhand der

Reaktion:

Oxalacetat + NADH ⟶ Malat + NAD^+ spektralphotometrisch nach der Oxidationsgeschwindigkeit des NADH gemessen. Die Enzymaktivität zeigt in dieser Reaktionsrichtung ein Optimum bei pH 8,5 und eine K_m für OAA bei 0,04 mM. Daneben stellte sich eine leichte Hemmung des Enzyms durch ATP heraus. In Abb.8. ist die Inhibitionskurve dargestellt.

Abb. 8. Inhibition der sMDH-Aktivität durch ATP.



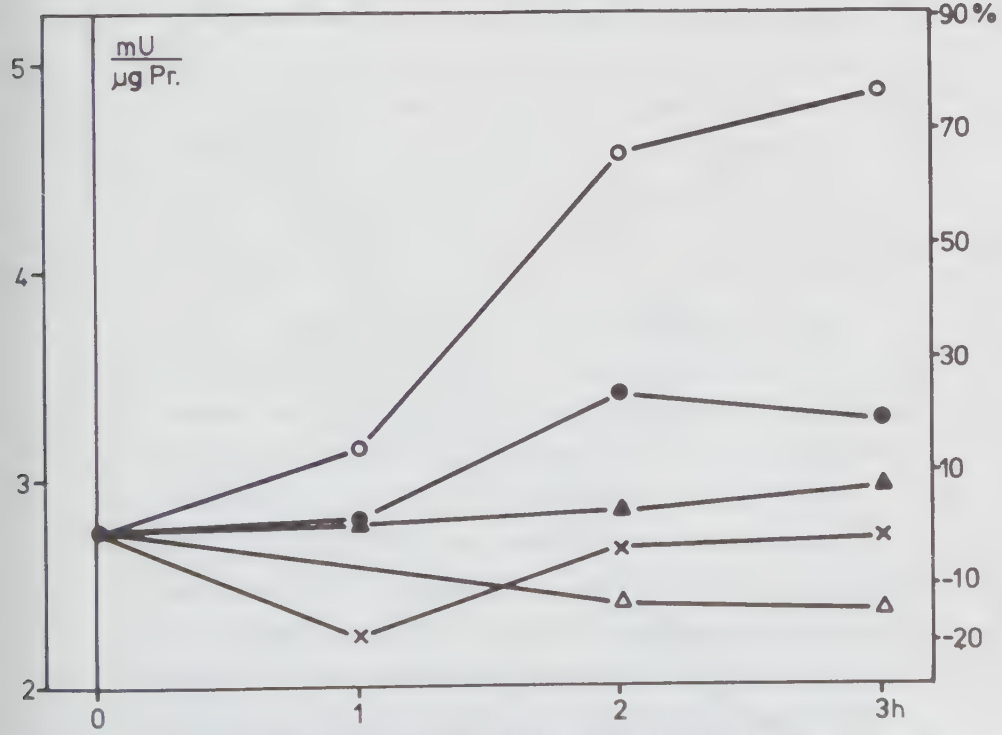
Ordinate: ΔV_{max} bedeutet die Differenz zwischen der Enzymaktivität nach zwei Stunden Trinactininkubation und der Aktivität desselben Extraktes nach Zugabe von ATP in die Testlösung.

Abszisse: Logarithmus der ATP-Konzentration (mM)

Die Inhibition der sMDH-Aktivität durch ATP wurde deutlich, nachdem die Speicheldrüsen eine Stunde in NM mit Trinactin inkubiert wurden und die Enzymaktivität einen höheren Wert annahm als in nicht behandelten Drüsenextrakten. Diese Erhöhung konnte durch Zugabe von ATP in Höhe von 1 mM zum Reaktionsgemisch reduziert werden auf einen Wert, der sich nicht signifikant von dem unbehandelter Drüsen unterschied. Nach längeren Inkubationszeiten von zwei und drei Stunden nahmen die gemessenen Aktivitäten Werte an, die deutlich höher sind als in den Kontrollen. Diese Steigerung erwies sich als hemmbar mit Cycloheximid.
Wenn die Puffinduktion durch ATP gehemmt wird, ist keine Erhöhung der sMDH-Aktivität zu erkennen. Ebenso tritt keine Änderung ein, wenn die Drüsen in NM mit Trinactin und ATP in Gegenwart von Oligomycin inkubiert wurden, obwohl unter diesen Bedingungen die Puffs induziert sind. Ein eventueller Einfluß von Oligomycin auf die Translation ist nicht bekannt. Dieser Befund steht noch im Widerspruch zu einer Korrelation zwischen Puffinduktion und Enzymaktivitätssteigerung.
Außerdem bewirkt die Inkubation der Drüsen in reinem NM ebenfalls einen leichten Anstieg in der sMDH-Aktivität. Dieser Effekt kann auf einer leichten Stimulation der MDH-Synthese beruhen, sowie auf dem Abfall des ATP-Spiegels unmittelbar nach der Isolation der Drüsen in NM (BEHNEL und KENSING 1975). Da die durch-

schnittliche Aktivität jedoch nach zwei und drei Stunden Inkubation in NM über den Kontrollwerten liegt, kann man vermuten, daß beide Ursachen hier wirksam werden. In den Abbildungen 8. und 9. sind die Ergebnisse der sMDH-Aktivitätsänderungen dargestellt.

Abb. 9. Aktivität der sMDH in Speicheldrüsenzellen von Drosophila in vitro.

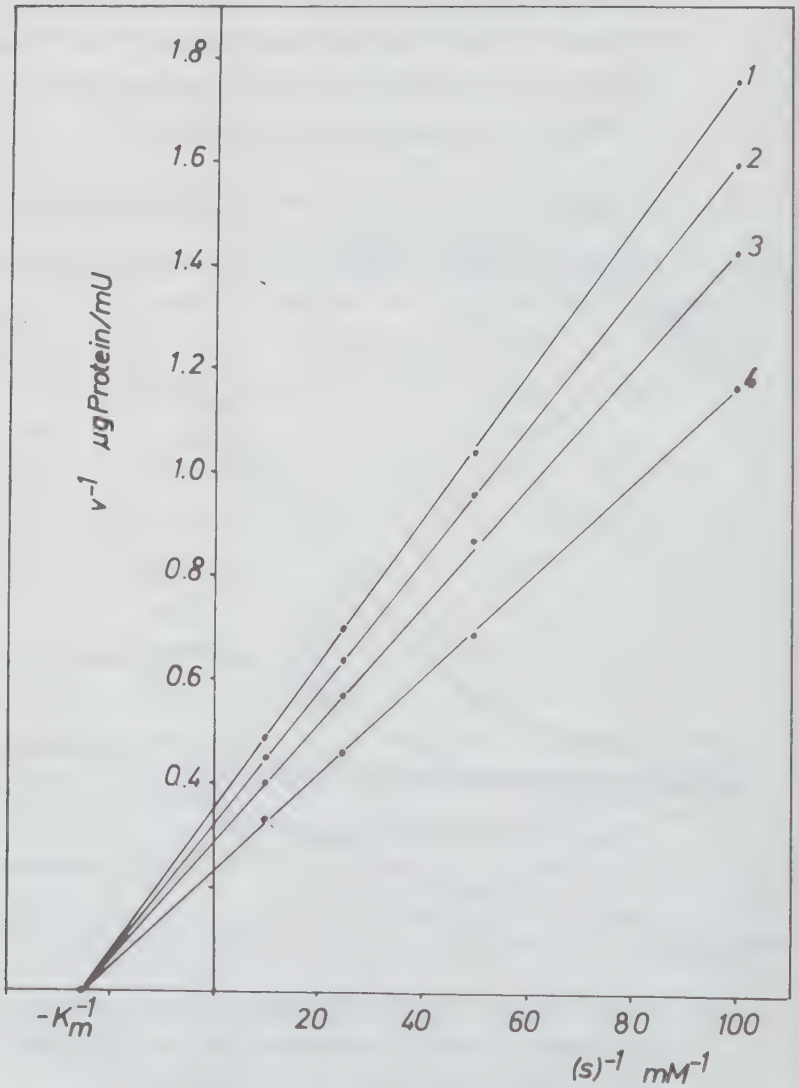


o Trinactin (1µM); ● NM; ▲ Trinactin (1µM) + ATP (1mM) + Oligomycin (1µM); × Trinactin (1µM) + ATP (1mM); △ Trinactin (1µM) + Cycloheximid (50 µg/ml).

Ordinate: Aktivität in mU/ µg Protein

Abszisse: Inkubationszeit in Stunden

Abb. 10. Kinetik der sMDH in Speicheldrüsenzellen von Drosophila in vitro.



Kurve 1.: Kontrolle ohne Behandlung; Kurve 2.: nach 1 Std. Trinactin (1µM); Kurve 3.: 2 Std. Trinactin (1µM) + ATP (1mM) im Test; Kurve 4.: 2 Std. Trinactin (1µM). Ordinate: $(mU/\mu g\ Protein)^{-1}$; Abszisse: $(mM\ OAA)^{-1}$.

3.2.4. Vergleich der Kinetiken von Puffinduktion und Enzyminduktion nach Anaerobiose.

Wie im Abschnitt 3.1.6. die Hitzepuffinduktion durch Anaerobiose und anschließender Sauerstoffzufuhr beschrieben wurde, führt auch die Haltung ganzer Larven für eine Stunde im Vacuum (o,1 atm) mit anschließender Luftzufuhr zu einer spezifischen Induktion der Puffs. Im Unterschied zur N_2-Begasung von isolierten Drüsen zeigt sich nach dieser Behandlung bereits eine Induktion aller Hitzepuffs bei Ablauf der Vacuuminkubation. - Diese Behandlung erwies sich bei isolierten Drüsen als so stark schädigend, daß hier keine Untersuchung der Chromosomen möglich war. - Aus Abb. 11. ist zu ersehen, daß die Puffs der nach Beendigung der Vacuumbehandlung sofort in Essig präparierten und fixierten larvalen Speicheldrüsen bereits eine beträchtliche Größe aufweisen. Werden die Larven nach Normalisierung des Drucks auf eine Atmosphäre unter normaler Luft weitergehalten, so steigt die Puffgröße innerhalb von 5 Minuten auf einen maximalen Wert an. Danach setzt die Regression der Puffs ein, die nach 30 bis 45 Minuten abgeschlossen ist. Ebenfalls 30 Minuten nach der Drucknormalisierung können die ersten Kontraktionen der zuvor regungslosen Larven beobachtet werden. Ein Vergleich der sMDH-Aktivität nach Beendigung einstündiger Anaerobiose und der relativen Puffgröße nach Vacuumbehandlung ist in Abb.12. wiedergegeben. Danach geht mit steigender MDH-Aktivität die Regression der Puffs einher, was auf einen regulativen Zusammenhang der beiden Größen hindeutet.

Abb. 11. Puffinduktion in Speicheldrüsen-Chromosomen von Drosophila in vivo nach Anaerobiose im Vacuum (o,1 atm).

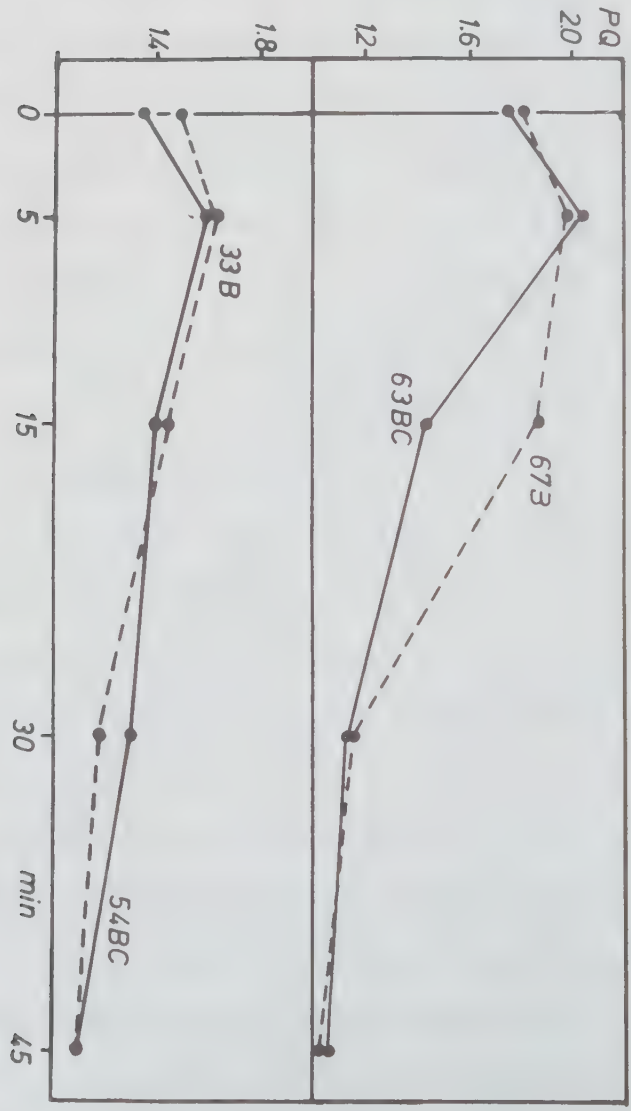


Abb 11a. Puffinduktion nach Anaerobiose.(Fortsetzung von Abb. 11.

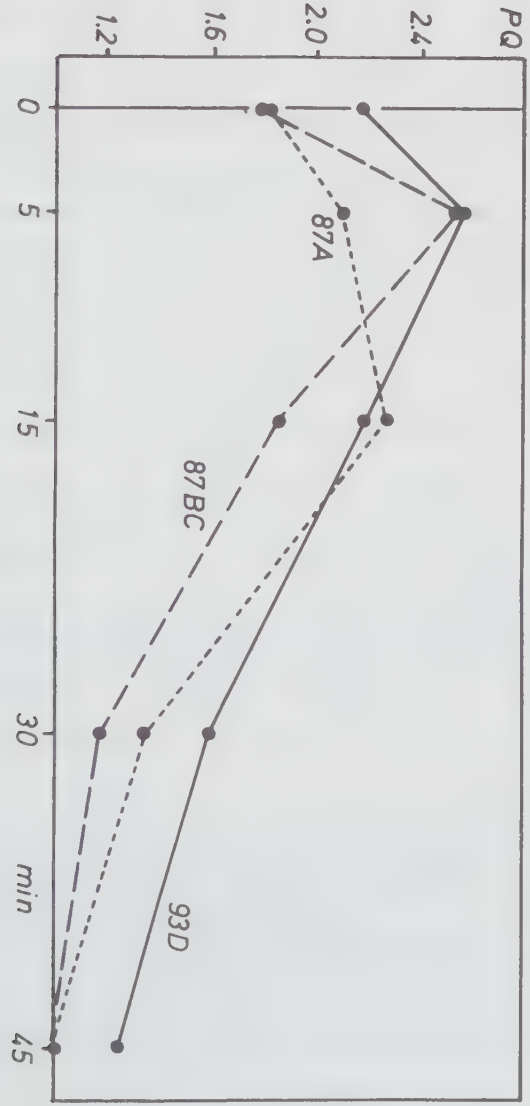
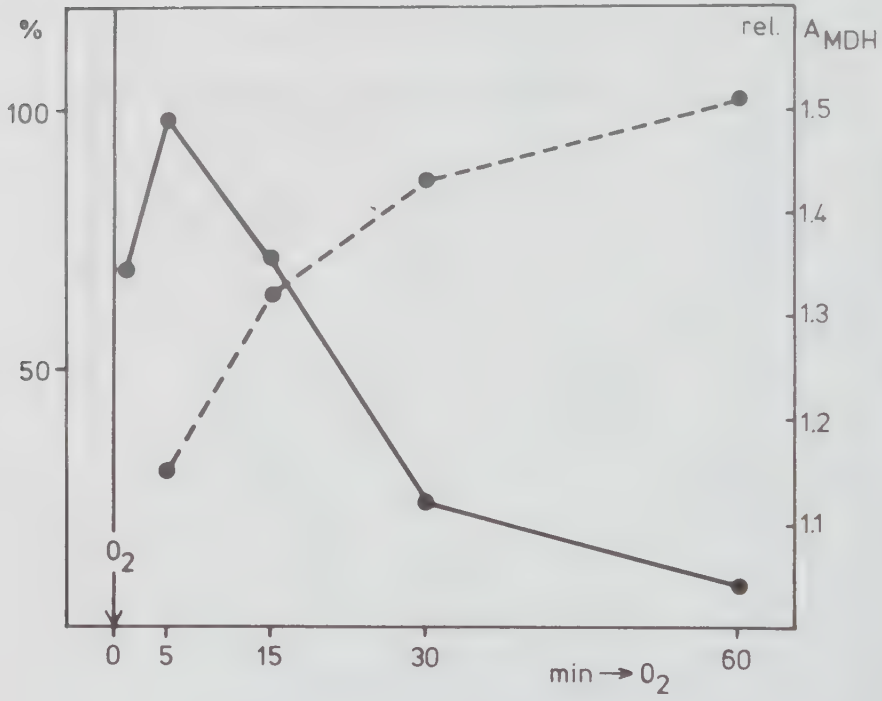


Abb. 12. Puffinduktion und Enzyminduktion (sMDH) in Drosophila Speicheldrüsen nach Beendigung anaerobiotischer Haltung ganzer Larven.



——— mittlere Puffgröße von 7 verschiedenen Regionen in Prozent maximaler Puffinduktion wie in Abb.11.

------ Aktivität der sMDH in relativen Werten nach Beendigung der Anaerobiose.

4. Diskussion

Aus den bisher bekannten Ergebnissen läßt sich die Vermutung ableiten, daß die Regulationsfaktoren für die Induktion der hitzespezifischen Puffs funktionell mit dem physiologischen Zustand des mitochondrialen Metabolismus gekoppelt sind. Dieser Verdacht stützt sich auf die Tatsachen, daß alle experimentell zur Puffinduktion führenden Bedingungen mitochondriale Funktionen beeinträchtigen und einen Abfall des intrazellulären ATP-Spiegels zur Folge haben.

Zudem wird in den meisten Fällen die Induktion dieser Puffs gehemmt, wenn den Zellen ATP exogen zur Verfügung steht und ein Absinken des intrazellulären Phosphorylierungspotentials verhindert wird.

Die ursprüngliche Annahme, die Änderung des freien ATP-Gehaltes der Zelle könne an dem Genregulationsmechanismus direkt beteiligt sein, mußte ausgeräumt werden, nachdem sich herausstellte, daß der induktionshemmende Effekt von ATP nicht in Gegenwart von Oligomycin eintritt (BEHNEL und RENSING 1975). Außerdem läßt sich die spezifische Puffinduktion durch Trinactin auch in Gegenwart von exogenem ATP erzielen, wenn die Adeninnukleotidtranslokase in der inneren Mitochondrienmembran mit Atractylosid kompetitiv gehemmt wird.

Daraus muß die Folgerung gezogen werden, daß nicht die aktuelle intrazelluläre ATP-Konzentration von Bedeutung bei der Puffregulation ist, sondern vermutlich ein

mitochondriales Intermediat, das im Gleichgewicht mit der ATP-Hydrolyse steht. Dieses Gleichgewicht wird gestört im Falle einer Blockierung der ATP-Translokase oder durch die Hemmung der mitochondrialen ATP-Hydrolyse mit Oligomycin.
Zur näheren Erläuterung hierzu soll auf die Wirkungsweisen von Trinactin und Valinomycin als Ionophore, Oligomycin und Atractylosid genauer eingegangen werden.

Trinactin und Valinomycin wirken als kationenspezifische Membran-Carrier mit starker Präferenz für Kalium. Sie sind von GRAVEN (1966) und PRESSMAN (1967) auf ihre Eigenschaften untersucht worden. Zusammengefaßt rufen sie folgende physiologische Änderungen an Mitochondrien hervor: 1. Akkumulation von K^+-Ionen unter Energieverbrauch
2. Steigerung des Protonen-Efflux
3. Schwellung der Mitochondrien
4. Stimulation und Steigerung der Atmung
5. Induktion der ATPase-Aktivität
6. Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung

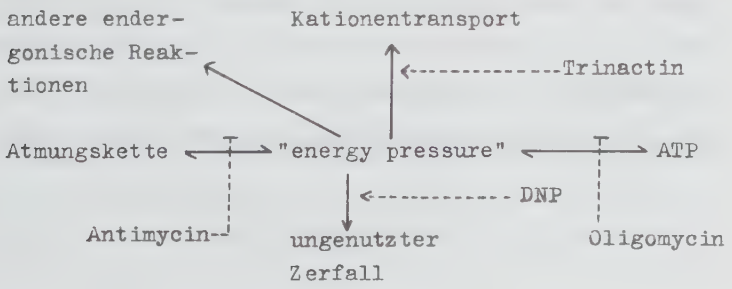
nach SIMON et al. (1969).

Nach Untersuchungen von ROTTENBERG (1972) beruht die K^+-Akkumulation durch Valinomycin auf einer Erhöhung der passiven Diffusion entlang eines elektrochemischen Membranpotentials, das durch eine nach außen gerichtete Protonenpumpe errichtet wird. Alle weiteren physiologischen Veränderungen sind demnach von sekundärer Natur und werden durch die primäre Verschiebung des mitochondrialen Membranpotential verursacht.

PINTO et al. (1970) berichten daneben über die Wirkung von K^+-Ionen bezüglich einer Atmungssteigerung, unabhängig von ihrem Einfluß auf die mitochondriale Substrataufnahme. Danach wird das Verhältnis der state 3- zur state 4-Atmung gesteigert unter Stimulierung der Atmungsaktivität in state 3. mit NAD-abhängigem Substrat. Der Effekt tritt nicht ein mit Succinat als oxidierbarem Substrat. Dies bedeutet, daß K^+-Ionen eine atmungssteigernde Wirkung im Kopplungsort I ergeben, die nicht auf einer Entkopplung selbst beruht, sondern wahrscheinlich auf Erniedrigung eines energiereichen Zustands.

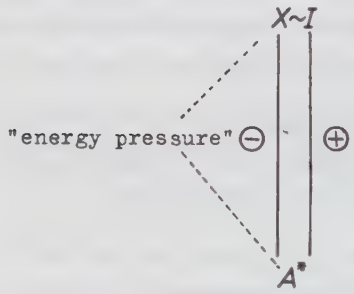
Nach Abb.13. steht das mit "energy pressure" bezeichnete energiereiche Intermediat (SLATER und TER WELLE 1969) des oxidativen Phosphorylierungssystems im Gleichgewicht mit den Redoxreaktionen der Atmungskette einerseits,andererseits mit der oligomycinsensiblen ATPase. Die geanaue Natur dieses "energy pressure" ist nicht bekannt, steht aber im Einklang mit den drei vorherrschenden Kopplungstheorien.

Abb.13. (Nach SLATER und TER WELLE 1969).



Danach besteht dieses energiereiche Intermediat entweder in einer chemischen Zwischenverbindung, in einem elektrochemischen Potential oder in einer besonderen polarisierten Konformation von Membranprotein (Abb. 14.).

Abb. 14. Primäre Konservierung von Energie



Chemokopplungs-

chemoosmotische Kopplungs-

Konformationstheorie
(Nach SLATER, TER WELLE, 1969)

In Übereinstimmung mit dem Schema in Abb. 13. fanden MOORE und PRESSMAN (1964), daß die für die Ionenakkumulation erforderliche Energie sowohl aus der ATP-Hydrolyse als auch aus dem Elektronentransport entnommen werden kann. Im ersteren Fall wirkt Oligomycin, im letzteren Antimycin hemmend auf den Ionentransport. Als Energiespender für die aktive Aufnahme von Kationen wurde hier ein nicht phosphoryliertes Energieintermediat postuliert.

Unter der Einwirkung von Entkopplern wie DNP und Ionophoren wir Trinactin und Valinomycin tritt ein verstärkter Zerfall des "energy pressure" in den Mitochondrien ein. Die Deckung dieses Defizits an Energie kann dabei

einerseits aus der Beschleunigung der Atmungskettenreaktionen, andererseits durch Stimulierung der ATP-Hydrolyse erfolgen, so daß bei genügend hohem Angebot von oxidierbarem Substrat und ATP eine ständige Neubildung des Energieintermediats nur verhindert wird, wenn beide Prozesse blockiert werden.

Nach SLATER und TER WELLE (1969) eignet sich Oligomycin als experimentelles Hilfsmittel zu Unterscheidung, ob eine Reaktion von ATP selbst oder von Intermediaten der oxidativen Phosphorylierung energiert wird. .. Dabei wird eine Reaktion durch Oligomycin gehemmt, wenn die hydrolytische Energie von ATP zuvor in ein energiereiches Intermediat überführt werden muß. In diesem Fall kann die aus der Atmungskette freiwerdende Energie genutzt werden. Wird dagegen die Atmungskette gehemmt und die Reaktion durch ATP energiert, so bewirkt Oligomycin keine Hemmung.

In ähnlicher Weise kann von der Atractylosid-Wirkung Rückschluß gezogen werden auf die Lokalisation einer mitochondrial gebundenen Reaktion (HELDT 1969). Hiernach hemmt Atractylosid mit exogenen ATP, nicht aber mit endogen gebildetem, wenn der Reaktionsort innerhalb der Mitochondrien liegt. Ist er außerhalb lokalisiert, hemmt Atractylosid nur unter Nutzung von endogenem ATP.

Analogisiert man diese Verhältnisse zu der spezifischen Induktion der Hitzepuffs, so stellt man fest, daß mit dem Zerfall des Energieintermediats durch Trinactin

erstens die ATPase, zweitens die Atmung der Drüsenzellen stimuliert wird. Gleichzeitig erfolgt die spezifische Induktion der Puffs. Diese wird gehemmt oder stark verzögert, wenn die Zellen exogenes ATP oder oxidierbares Substrat angeboten bekommen. Hier wirkt Oxalacetat als zusätzlicher Protonenakzeptor im NADH-Zyklus stärker als Malat und Succinat.

Darüber hinaus kann ATP seine puffhemmende Wirkung nicht entfalten in Gegenwart von Oligomycin oder Atractylosid.

Diese Tatsachen geben Grund zu der Annahme, daß die Freisetzung von puffinduzierenden Faktoren, oder eines Faktors, seinen Ursprung im intramitochondrialen Metabolis nimmt oder an diesen gekoppelt ist unter Mitwirkung eines energieübertragenden Systems.

Die Induzierbarkeit der Hitzepuffs durch Oligomycin allein, die von LEENDERS et al. (1972) bei Drosophila hydei nicht gefunden werden konnte, in eigenen Experimenten jedoch wiederholt Bestätigung fand- hier muß auf die deutliche Dosisabhängigkeit hingewiesen werden (BEHNEL,RENSING 1975)- deutet erneut darauf hin, daß die Senkung des intrazellulären ATP-Spiegels nicht den Initialfaktor für die Puffinduktion bildet, denn exogenes ATP bleibt während der Inkubation der Drüsen mit Oligomycin ohne Einfluß auf die Puffbildung. Vielmehr scheint die feste Bindung von Oligomycin an den hypothetischen X-I-Komplex (SHAW 1967) und damit die Blockierung des Energieübertragungs-

systems Ursache für die Freisetzung geninduzierender Faktoren zu sein. Unwahrscheinlich ist die Annahme, daß die Hemmung der Atmung, wie sie durch Oligomycin in verschiedenen Geweben unterschiedlich bewirkt wird (SHAW 1967; SLATER et.al. 1969), der entscheidende Effekt zur Puffinduktion ist, da in manchen Geweben die Atmunsinhibition durch Oligomycin überraschend unerheblich ist, zum anderen eine Induktion der Puffs unter gerade umgekehrtem Verhältnis mit Trinactin eintritt. Außerdem spricht dagegen, daß KCN in relativ hoher Dosis die Atmung entschiedener hemmt, ohne Einfluß auf die Puffgröße zu nehmen.

Wenn man in Erwägung zieht, daß unter Hemmung der Atmungskette durch KCN eine gesteigerte glycolytische Substratphsophorylierung für ATP-Synthese sorgt, erscheint es denkbar, daß der oben erwähnte "energy pressure" durch glycolytisch gebildetes ATP noch soweit ergänzt werden kann, daß ein Schwellwert, der zur Freisetzung puffinduzierender Faktoren führt, nicht unterschritten wird.

Diese Vermutung erhält Unterstützung aus der Beobachtung, einer deutlichen Puffinduktion nach Inkubation der Drüsen in KCN und Atractylosid gleichzeitig, während beide Inhibitoren für sich keine induzierende Wirkung zeigen.

Eine ähnliche Beobachtung machten LEENDERS et al. (1972) bei der Behandlung von Speicheldrüsen mit einer Kombination von KCN und Oligomycin, die einzeln keine Puffs induzierten, zusammen jedoch wirksam waren.

In beiden Fällen wird die Hydrolyse cytoplasmatischen ATPs durch Mitochondrien verhindert und somit die Bildung von Energieintermediat auf diesem Wege.

Ebenso ist es möglich, daß durch die Trennung des dynamischen Zusammenhanges beider Zellkompartimente mit Atractylosid und Oligomycin für Adeninnukleotid cytoplasmatisches ATP der Transskription verfügbar ist, während durch KCN die Freisetzung eines Induktionsfaktors aus dem mitochondrialen Raum bewirkt wird. Ohne diese Trennung könnte cytoplasmatisches ATP durch die Mitochondrien hydrolysiert werden und erstens die Bildung des "Induktors" verlangsamen, zweitens aber auch in nicht mehr genügender Menge für eine optimale Transskriptionsrate vorhandensein.

Dies scheint auch die Begründung dafür zu sein, daß während der Anaerobiosephase unter N_2-Begasung keine Puffinduktion auftritt. Aufgrund der sehr schnellen Induktion der Puffs nach Beendigung der Anaerobiose muß auf das bereits Vorhandensein eines Induktors geschlossen werden. Die Transskription und damit die Puffentwicklung bleibt jedoch aus Mangel an ATP aus. Erst nach Wiederherstellung aerober Verhältnisse beginnt die Transskription und Puffbildung unter rascher Regeneration des ATP-Spiegels.

Diese Erklärung wurde auch von LEENDERS et al.(1974) vorgeschlagen, da nach zweistündiger Haltung isolierter Speicheldrüsen unter Anaerobiose kein ATP mehr in

den Drüsenzellen nachgewiesen werden konnte.
Ebenfalls kann diese Begründung in Übereinstimmung gebracht werden mit der Tatsache, daß die anaerobiose-ähnliche Behandlung der Larven in einem Luftraum verminerten Druckes, in dem der Sauerstoffpartialdruck auf 10% herabgesetzt ist, die Puffinduktion bewirkt ehe der normale O_2-Partialdruck wieder hergestellt ist. Hierdurch tritt ebenfalls eine Verlangsamung der Atmungsreaktionen und ein Abfall des Phosphorylierungspotentials ein, ohne daß der ATP-Spiegel soweit absinkt, daß keine Transskription mehr möglich wäre.

Die relativ schnelle Regression der Puffs innerhalb von 30 Minuten nach Normalisierung des Luftdrucks hier im Gegensatz zu dem langsamer verlaufenden Prozeß nach N_2-Begasung und anschließender O_2-Zufuhr zeigt, daß die Transskriptionsprodukte eher gebildet werden, wenn man diesen eine fuktionelle Rolle bei der Puffregression zuschreibt, wie es bei BERENDES (1972) geschieht.
Ein Argument für diese Annahme liegt auch in der Möglichkeit, die Puffregression nach Anaerobiose-Induktion durch Cycloheximid zu verzögern. Da hier aber keine vollständige Hemmung vorliegt, und die Puffs auch ohne die Neusynthese von Protein zurückgebildet werden, kann der Geninduktion und den Genprodukten nur eine akzessorische Rolle zukommen, in der durch Beschleunigung entscheidender Stoffwechselreaktionen für die Normalisierung des energetischen Zellhaushalts gesorgt wird.

Die Messungen der Enzymaktivitäten nach Induktion der Hitzepuffs ergaben eine Zunahme der Lactat-Dehydrogenase- und Malat-Dehydrogenase-Aktivität, die sich in beiden Fällen als hemmbar mit Cycloheximid erwies. Vom stoffwechselregulatorischen Standpunkt aus gesehen kann der Steigerung beider Enzymaktivitäten eine kompensatorische Rolle bei der durch Trinactin hervorgerufenen Störung in den Mitochondrien zukommen. Das Vorkommen der LDH in Drosophila-Larven wurde untersucht von RECHSTEINER (1970). Danach läßt sich die LDH in zunehmender Aktivität mit Beginn der frühen Embryogenese nachweisen. Nach dem Schlüpfen der Larven steigt die spezifische Aktivität der LDH mit zunehmendem Wachstum des Organismus über alle drei Larvenstadien und erreicht ihr Maximum in der späten Phase des dritten Stadiums. Nach der Puppenbildung nimmt die Aktivität stätig ab und läßt sich bei adulten Individuen nur noch in sehr geringer Menge nachweisen.

Hinsichtlich des gewebespezifischen Vorkommens der LDH wurde die größte Aktivität im Muskelgewebe gefunden. Daneben ließ sich LDH-Aktivität im Gehirn, dem Ventralganglion, den Imaginalscheiben und in der Epidermis nachweisen. Über den LDH-Gehalt in Speicheldrüsen wird dort zwar nicht berichtet, er ergab sich aber aus den Untersuchungen in dieser vorliegenden Arbeit.
Die von RECHSTEINER durchgeführte elektrophoretische Analyse ergab für die LDH nur eine Bande und keinen Unterschied zwischen larvalem und adultem Enzym. Aus

diesem Grund konnten bisher keine Erkenntnisse über die Genetik der LDH gewonnen werden.

Der LDH-Aktivitätssteigerung nach Hitzepuffinduktion kommt die Bedeutung der gesteigerten Milchsäure-Gärung bei abfallendem Phosphorylierungspotential infolge der Inhibition mitochondrialer Phosphorylierung zu. Da die nach den hier vorliegenden Ergebnissen auftretende Puffbildung wahrscheinlich mit der Größe mitochondrialen Energieintermediats korreliert zu sein scheint, ist die Steigerung der Milchsäure-Gärung über genetische Regulation von biologisch sinnvoller Bedeutung. Durch sie wird der Mangel an mitochondrialem Phosphorylierungspotential durch die ATP-Synthese auf dem Wege der glycolytischen Gärung wenigstens teilweise ausgeglichen. Dieser Reaktionsweg kann sicherlich nur im Falle einer Atmungshemmung beschritten werden, da bei Atmungssteigerung beide Prozesse, die Lactat-Gärung und die mitochondriale Pyruvat-Oxidation kompetieren. Inwieweit der zelluläre Regulationsmechanismus unterscheiden kann zwischen einem Abfall des Phosphorylierungspotentials aufgrund der Entkopplung oxidativer Phosphorylierung oder aufgrund einer Inhibition der Atmung ist jedoch nicht bekannt. Diese Frage ist im vorliegenden Fall der Hitzepuffregulation bedeutsam, da nicht gesichert ist, ob die Regulation der Hitzepuffs demselben Mechanismus unterliegen oder getrennt voneinander kontrol-

liert werden. In der jüngsten Arbeit von BONNER und PARDUE (1976) wird diesbezüglich von einem hitzespezifischen Puff berichtet, der demnach unabhängig von den anderen kontrolliert zu werden scheint.

Eine ebenfalls biologisch sinnvolle Reaktion kann in der genetisch regulierten Steigerung der sMDH-Aktivität gesehen werden als Folge der Hemmung mitochondrialer Phsophorylierung.
Dies begründet sich einmal aus der Bedeutung der sMDH bei der Beteiligung am NADH-Transport aus dem cytoplasmatischen Raum in den mitochondrialen über den Malat-Oxalacetat-Zyklus, der bei gesteigerter Atmung von Bedeutung wird, andererseits wird NAD^+ für die Glycolyse regeneriert.

Unter der Voraussetzung, daß die gesteigerte Enzymaktivität als Produkt der in den Puffs induzierten Gene angesehen werden kann stellt sich sie Frage einer möglichen Zuordnung eines Enzyms zu einem spezifischen Puff. Im Fall der LDH ist dies nicht möglich, da bisher nichts über die Genetik der LDH und der Lokalisation des LDH-Gens im Genom bekannt ist.
Von der sMDH wurde jedoch bei O'BRIEN et al. (1969) und bei ANDERSON et al. (1971) berichtet, daß dieses Enzym von einem Gen auf dem zweiten Chromosom kontrolliert werde. Aus Rekombinationsexperimenten mit zwei

elektrophoretischen Varianten wurde dieses Gen in den Positionen 2L/ 40.1 und 35.3 der Genkarte von Drosophila melanogaster lokalisiert. Ein Vergleich der relativen Lage dieses Genorts mit der Lage der Hitzepuffs auf der Chromosomenkarte von BRIDGE (1935) ergibt eine Möglichkeit linearer Zuordnung des sMDH-Gens und der hitzespezifischen Puffregion 33 B.
Alle anderen Enzyme, deren Gene kartiert sind (Tabelle 10), lassen sich keinem der übrigen Puffloci direkt linear zuordnen.

Da die sMDH auch nach Inkubation der Drüsen in reinem NM eine Aktivitätssteigerung erkennen läßt, ohne daß die Hitzepuffs morphologisch eine Induktion zeigen, und weil außerdem die Grundaktivität in unbehandelten Drüsen schon relativ zu anderen Enzymen hoch ist, kann man annehmen, daß die Aktivierung des sMDH-Gens keine Alles-oder-Nichts-Reaktion darstellt, sondern dynamisch moderierbar ist. Nach ZHIMULEV et al. (1975) zeigen viele Regionen mit kleinem Puffs -hierunter fallen auch die Interbanden- konstante Transskriptionsrate, die nach Puffbildung auf das zehn- bis hundertfache gesteigert werden kann.
Unter der Voraussetzung, daß die Hitzepuffs Gene für Enzyme des intermediären Stoffwechsels enthalten, und daß sie in verschiedenen Experimenten unterschiedliche Reaktionen zeigen, kann man für diese Gruppe von Puffs ein dynamisches Regulationsprinzip zugrunde legen. Dieses steht auch im Einvernehmen mit dem in Abb. 15 vorgeschlagenen Regulationsmechanismus.

Tabelle 10. Kartierung der Enzym-Gen-Positionen

Enzym	Gen-Position		Autoren
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	X	0.9	(YOUNG, 1966)
Fumarat-Hydratase	X	19.9	(MADHAVAN,URSPRUNG,1973)
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	X	62.8	(SEECOF,1969)
Glycerophosphat-Dehydrogenase	2L	17.8	(GRELL,1967)
		20.0	(O'BRIEN,1972)
Alkohol-Dehydrogenase	2L	50.1	(GRELL,1965)
s-Malat-Dehydrogenase	2L	35.3	(O'BRIEN,1969)
		40.1	(ANDERSON,GRELL,1971)
		40.2	(ANDERSON,GRELL,1971)
Hexokinase	2R	73.0	(MADHAVAN,1972)
		73.5	(JELNES,1971)
Amylase	2R	77.3	(DOANE,1969)
		77.9	(BAHN 1968)
		78.1	(KIKKAWA,1964)
		78.4	(BAHA,1968)
		80.0	(KIKKAWA,1960)
Isocitrat-Dehydrogenase	3L	27.1	(FOX,1971)
Phosphoglucomutase	3L	43.4	(HJORTH,1970)
		43.6	(TRIPPA,1970)
alkal.Phosphatase	3R	46.3	(MCINTYRE,1966)
		47.3	(WALLIS,1968)
saure Phosphatase	3R	101.4	(MACINTYRE,1966)
Oktanol-Dehydrogenase	3R/	49.1	(COURTRIGHT,1966)

4.1. Ein hypothetisches Modell für den Kontrollmechanismus der Genaktivierung in den Hitzepuffs der Speicheldrüsenkerne von Drosophila.

In diesem Modell wird versucht, den funktionellen Zusammenhang zwischen den Wirkungsmechanismen der in dieser Arbeit benutzten Inhibitoren zellulären Stoffwechsels und der durch diese Substanzen hervorgerufenen Steuerung der hitzespezifischen Puffaktivität darzustellen.

Dabei beruht der Aktivierungsmechanismus der hitzesensiblen Puffgruppe hier möglicherweise auf einem Dephosphorylierungsprozeß, durch den die Inaktivierung eines Repressors oder Bildung eines Induktors bewirkt wird als Folge der Abnahme energiereichen Intermediats der Atmungskettenphosphorylierung.

Aufgrund der sehr schnellen Puffinduktion nach Beendigung der Anaerobiose und während der Temperaturschockbehandlung wird davon ausgegangen, daß die erforderlichen Regulatormoleküle ständig im Cytoplasma anwesend sind.

Diese Annahme steht in Übereinstimmung mit den Befunden von HELMSING und BERENDES (1971), nach denen die Akkumulation einer sauren Proteinfraktion in isolierten Kernen mit der Bildung von Hitzepuffs korreliert ist.

Das Erscheinen dieser Kern-Protein-Fraktion mit einem Molekulargewicht um 23000 ist unabhängig von der Proteinneosynthese und wird bei der Puffinduktion mit dem

Regulationsprozeß in Zusammenhang gebracht.

Über die Bedeutung saurer Proteine bei der spezifischen Regulation von Genaktivität und die Modifikation ihrer Funktionen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung berichten STEIN et al. (1975).
Daneben machten WHITFIELD und PERRIS (1968) Feststellungen über die Bedeutung von Energieintermediaten der oxidativen Phosphorylierung bei der Bildung von Phosphoproteinen und deren Wirkung auf die Chromatinstruktur.

Diese Befunde in Verbindung mit der hier aufgezeigten Bedeutung des Energieintermediats bei der Puffkontrolle gaben den Anstoß für die Erstellung des vorliegenden Modells (Abb. 15.).

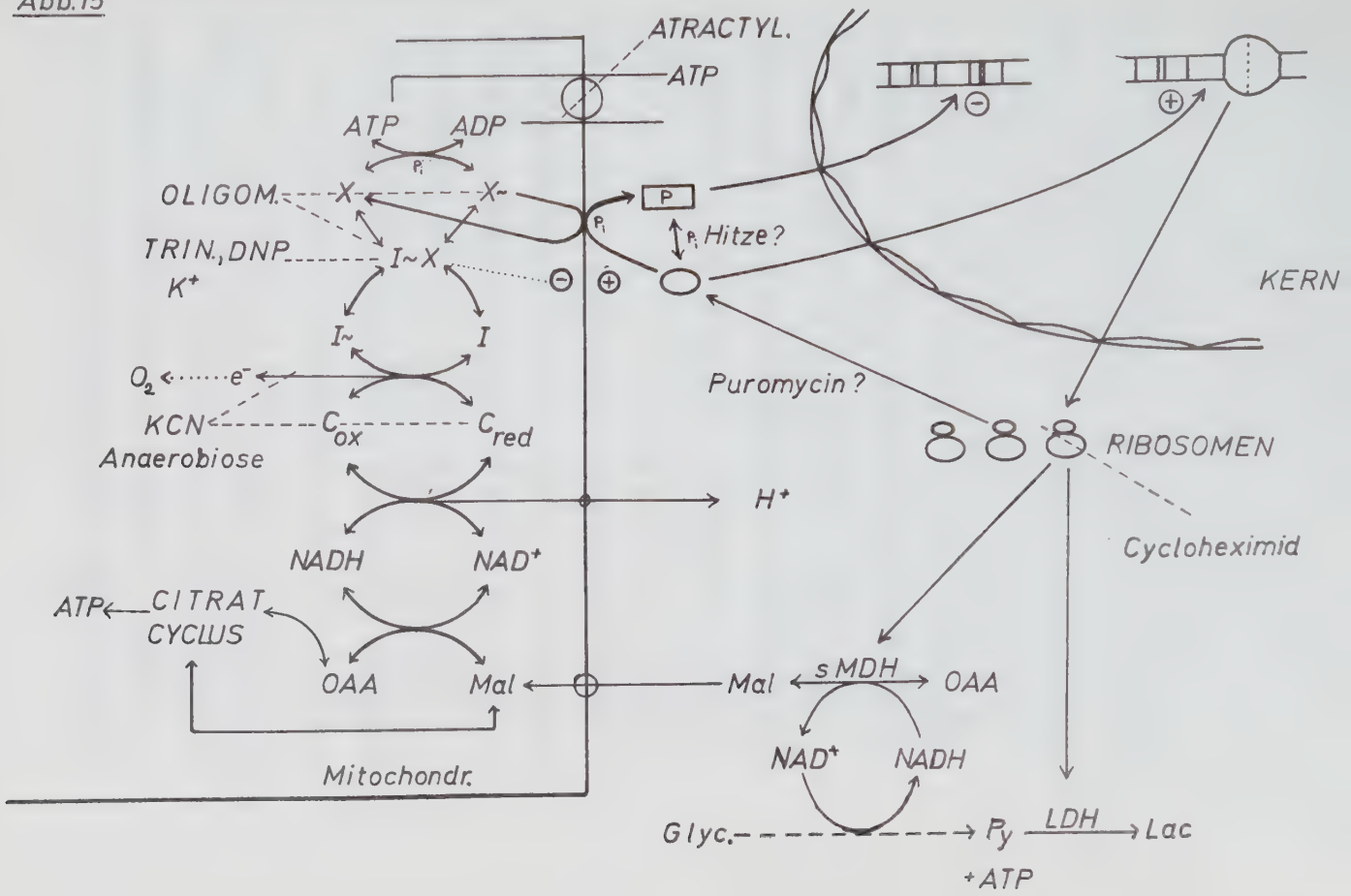
Dargestellt sind die Angriffspunkte der Inhibitoren in der Atmungskettenphosphorylierung. Trinactin und DNP wirken direkt auf das Energieintermediat (X-I) im Sinne eines verstärkten Zerfalls. Oligomycin hemmt, durch Komplexbildung mit X-I, die an dieses Intermediat gekoppelten Reaktionen, wobei der genauere Angriffpunkt zwischen dem energiereichen Intermediat und der endständigen ADP-Phosphorylierung zu suchen ist (SHAW, 1967). Atractylosid hemmt die Adeninnukleotid-Translokation über die Mitochondrienmembran, während durch Anaerobiose und KCN die Redoxreaktionen des Elektronenflusses über die Cytochrome blockiert werden.

Die hypothetische Phosphorylierung des Proteins erfolgt unter Verwendung des Energieintermediats, das mit der Atmungskette und der endständigen ATPase im Gleichgewicht steht. Durch Zerstörung des Intermediats selbst oder durch Blockierung beider gekoppelten Gleichgewichtsreaktionen reichert sich dephosphoryliertes Protein an, das eine induzierende Wirkung entfaltet.

Gleichzeitig ist die Wirkung von Cycloheximid angedeutet, das durch Blockierung der Proteinsynthese die Bildung sekundärer Genprodukte verhindert und so indirekt die Normalisierung des zellulären Energiepotentials und die Puffregression verzögert.

Die in dem Modell verzeichneten Fragezeichen beziehen sich einerseits auf die bei SCHOON und RENSING (1973) beschriebene Puffinduktion durch Puromycin, die möglicherweise in der Freisetzung unphosphorylierten Proteins von den Ribosomen begründet ist. Andererseits kann die schnelle Puffinduktion durch Temperaturschock aus einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Form des Signal-Moleküls resultieren.

Abb.15


ATRACTYL.
ATP
ATP
ADP
OLIGOM.
X
X~
P
TRIN., DNP
K+
I~X
Hitze?
KERN
I~
I
O2
e-
Puromycin?
KCN
Cox
Cred
RIBOSOMEN
Anaerobiose
H+
Cycloheximid
NADH
NAD+
ATP
CITRAT CYCLUS
OAA
Mal
sMDH
Mitochondr.
NAD+
NADH
Glyc.
Py
LDH
Lac
+ATP

5. Zusammenfassung

1. Die Chromosomenregion 2R/ 54 BC läßt sich nach Behandlung der Speicheldrüsen mit Temperaturschock (37°C) als Puff induzieren. Ebenso bewirken Trinactin und Valinomycin (1µM) eine spezifische Induktion, die mit exogenem ATP hemmbar ist.

2. Trinactin (1µM) und andere entkoppelnde Substanzen wie Oligomycin (50 µM) induzieren die spezifische Bildung hitzesensibler Puffs. Die Puffgröße steigt während der ersten Stunde und erreicht nach etwa zwei Stunden ein Maximum. Unter Einwirkung dieser Substanzen tritt innerhalb von sechs Stunden keine Regression der Puffs ein.

3. Trinactin induziert ebenso die de novo Synthese respiratorischer Enzyme wie der sMDH und der LDH. Die Aktivität der Enzyme steigt während zweistündiger Inkubation und erreicht ein Maximum nach etwa drei Stunden. Die Steigerung der Enzymaktivität ist hemmbar in Gegenwart von Cycloheximid (50 µg/ ml).

4. Exogenes ATP hemmt die Puffinduktion sowie die Enzyminduktion mit Trinactin. Dieser Effekt von ATP wird hinsichtlich der Puffinduktion gehemmt mit Oligomycin (1µM) oder Atractylosid (100µM). Beide Substanzen bewirken allein keine Induktion.

5. Atractylosid (10^{-4}M) in Kombination mit KCN (5mM) induzieren die Hitzepuffs, während KCN allein keine Wirkung zeigt.

6. Oxalacetat (10 mM), Malat und Succinat hemmen die Puffbildung mit Trinactin. Dabei reagieren verschiedene Puffs unterschiedlich auf den Effekt der Metaboliten.

7. Glycolytische Intermediate zeigen keine vergleichbare Wirkung auf die Puffinduktion mit Trinactin.

8. Tempraturschock, sowie Sauerstoffzufuhr nach Anaerobiose induzieren maximale Puffbildung innerhalb von 5 bis 15 min. Maximale Enzymaktivität erscheint nach 60 bis 120 min.

9. Die Puffregression nach Induktion durch Anaerobiose wird verzögert durch Cycloheximid (50 µg/ ml).

10. Der Aktivierungsmechanismus der hitzesensiblen Puffs wird in einem Dephosphorylierungsprozeß vermutet, durch den die Inaktivierung eines Repressors oder möglicherweise die Bildung eines Aktivators verursacht wird. Dieser Prozeß wird als Folge einer Abnahme energiereichen Intermediats der oxidativen Phosphorylierung angesehen, da Puffbildung nur dann eintritt, wenn dieses Intermediat direkt zerstört wird oder indirekt, durch Blockierung seiner Gleichgewichtsreaktionen.

11. Es wird vermutet, daß das Energieintermediat durch ATP-Hydrolyse oder durch die Atmungskette gebildet wird. Beide Reaktionen werden gesteigert durch exogenes ATP und Zugabe oxidierbaren Substrats, unter Einwirkung von Entkopplern. Hierdurch wird auch die Puffinduktion gehemmt.

12. Die Wirkung von Oxalacetat, Malat, und Succinat wird in einer Steigerung der Atmungskettenreaktionen und der ATP-Synthese durch Substratphosphorylierung vermutet. Unterschiedliche Reaktionen der Puffs auf die Metaboliten kann durch unterschiedliche Affinitäten der Chromosomenregionen zu dem Aktivatormolekül erklärt werden.

13. Die schnellere Induktion der Puffs und Enzyme nach Hitzeschock mag auf dem Einfluß der Temperatur auf das Gleichgewicht zwischen dem phosphorylierten und dephosphorylierten Zustand des Signalmoleküls zurückzuführen sein. Im Falle der Anaerobiose wird vermutet, daß die schnelle Reaktion durch Akkumulation des dephosphorylierten Proteins während der Anaerobiosephase verursacht wird.

6. Literaturverzeichnis

Ashburner,M. (1967) : Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila.
I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of Drosophila melanogaster.
Chromosoma 21, 398-428

Ashburner,M. (1969) : Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila.
II. X chromosome puffing patterns in Drosophila melanogaster and D. simulans.
Chromosoma 27, 47-63

Ashburner,M. (1970) : Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila.
V. Responses to environmental treatments.
Chromosoma 31, 356-376

Ashburner,M. (1972) : Ecdysone induction of puffing in polytene chromosomes of D. melanogaster.
Effects of inhibitors of RNA synthesis.
Exp. Cell Res. 71, 433-440

Ashburner,M. (1974) : Sequential gene activation by Ecdysone in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster.
II. The effects of inhibitors of protein synthesis.
Developmental Biology 39, 141-157

Bahn, E. (1968) : Crossing over in the chromosomal region determining amylase isozymes in Drosophila melanogaster.
Hereditas 58, 1-12

Beermann,W.
G.R. Bahr (1954) : The submicroscopic structure of the Balbani ring
Exp. Cell Res. 6, 195-201

Beermann,W. (1952) : Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans.
Chromosoma 5, 139-198

Beermann,W. (1964) : Control of differentiation at the chromosomal level.
J. Exp. Zool. 157, 49-62

Beermann,W. (1971) : Effect of -Amanitin on puffing and intranuclear RNA synthesis in Chironomus salivary glands.
Chromosoma 34, 152-167

Behnel,J
L. Rensing (1975) : Respiratory functions involved in the induction of puffs in Drosophila salivary glands.
Exp. Cell Res. 91, 119-124

Berendes,H.D. (1972) : The control of puffing in Drosophila hydei.
In: Developmental Studies on Giant Chromosomes. (Ed.: W. Beermann, J. Reinert, H. Ursprung)
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1972)

Bonner,J.J.
M.L. Pardue (1976) : The effect of heat shock on RNA synthesis in Drosophila tissues.
Cell 8, 43-50

Brideges, C.B. (1935): Salivary gland chromosome maps with an key to the binding of the chromosomes of Drosophila melanogaster. J. Hered. 26, 60-64

Clever, U.
P. Karlson (1960) : Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch Ecdyson. Exp. Cell Res. 20, 623-626

Courtright, J.B.
R.B. Imbersky
H. Ursprung (1966) : The genetic control of alcohol dehydrogenase and octanol dehydrogenase isoenzymes in Drosophila. Genetics 54, 1251-1260

Doane, W.W. (1969) : Amylase variants in Drosophila melanogaster: Linkage studies and characterization of enzyme extracts. J. Exp. Zool. 171, 321-342

Ellgaard, E.G.
U. Clever (1971) : RNA metabolism during puff induction in Drosophila melanogaster. Chromosoma 36, 60-78

Ellgaard, E.G. (1972): Similaryties in chromosomal puffing induced by temperature shock and Dinitrophenol in Drosophila. Chromosoma 37, 417

Fox, D.J. (1971) : The soluble citric acid cycle enzymes of Drosophila melanogaster. I. Genetics and Ontogeny of NADP-linked isocitrate dehydrogenase. Biochemical Genatics 5, 69-80

Graven, S.N.
H.A. Lardy
D. Johnson
A. Rutter (1966) : Antibiotics as tools for metabolic studies.
V. Effect of Nonactin, Monactin, Dinactin and Trinactin on oxidative phosphorylation and adenosine triphosphatase induction.
Biochem. 5, 5 1729-1735

Grell, E.H.
K.B. Jacobson
J.B. Murphy (1965) : Alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster: Isoenzymes and genetic variants.
Science 149, 80-82

Grell, E.H. (1967) : Electrophoretic variants of a-glycerophosphate dehydrogenase in Drosophila melanogaster.
Science 158, 1319-1320

Heldt,H.W. (1969) : The inhibition of adenine nucleotide translocation by atractyloside.
In: Inhibitors- Tools in Cell Research
Springer-Verlag (Berlin,Heidelberg, New York 1969).

Helmsing, P.J.
H.D. Berendes (1971): Induced accumulation of nonhistone proteins in polytene nuclei of Drosophila hydei.
J. Cell Biol. 50, 893-896

Hjorth,J.P. (1970) : A phosphoglucomutase locus in Drosophila melanogaster.
Hereditas 64, 146-148

Jelnes, J.E. (1971) : Identification of hexokinases and localization of a fructokinase and a tetrazolium oxidase locus in Drosophila melanogaster.
Hereditas 67, 291-293

Kikkawa, H. (1960) : Further studies on the genetic control of amylase in Drosophila melanogaster. Jap. J. Gent. 33, 382-387

Kikkawa, H. (1964) : An elektrophoretic study on amylase in Drosophila melanogaster. Jap. J. Genet. 39, 401-411

Leenders, H.J. H.D. Berendes (1972): The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in Drosophila. I. The induction of gene activity. Chromosoma 37, 433-444

Leenders, H.J. P.J.A.Beckers (1972): The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in Drosophila. A correlation between induced gene activity and an increase in activity of a respiratory enzyme. J. Cell Biol. 55, 257-265

Leenders, H.J. A. Kemp J.F.J.G.Koninkx J. Rosing (1974) : Changes in cellular ATP, ADP,and AMP levels following treatments affecting cellular respiration and the activity of certain nuclear genes in Drosophila salivary glands. Exp. Cell Res. 86, 25-30

Lowry, O.H. N.J. Rosebrough A.L. Farr R.J. Randell (1951): Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol.Chem. 193, 265-275

MacIntyre, R.J.(1966): Locus of the structural gene for third larval instar alkaline phosphatase. DIS 41, 62

MacIntyre,R.J.(1966): The genetics of an acid phosphatase in Drosophila melanogaster and Drosophila simulans.
Genetics 53, 461-474

Madhavan,K.M.
H. Ursprung (1973) : The genetic control of fumarat hydratase (fumarase) in Drosophila melanogaster.
Mol.Gen.Genet. 120, 379-380

Madhavan, K.M.
D.J. Fox
H.Ursprung (1972) : Developmental genetics of hexokinase isozymes in Drosophila melanogaster.
J.Insect.Physiol. 18, 1523-1530

McReynolds, M.S.
G.B. Kitto (1970) : Purification and properties of Drosophila malate dehydrogenases.
Biochim.Biophys.Acta 198, 165-175

Moore, C.
B.C. Pressman (1964): Mechanism of action of Valinomycin on mitochondria.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 15,6 ;562-567

Nagel, G.
L.Rensing (1971) : Puffing patterns and puff size of Drosophila salivary gland chromosomes in vitro.
Cytobiologie 3, 2 ; 288-292

Nagel, G.
L.Rensing (1974) : Circadian rhythm in size and ^{3}H-uridine incorporation of single puffs of Drosophila salivary glands in vitro.
Exp. Cell Res. 89,436-439

O'Brien, S.J.
R.J. MacIntyre (1972): The a-glycerophosphate in Drosophila melanogaster. II. Genetic aspect.
Genetics 71, 127-138

Pelling, C. (1964) : Ribonukleinsäure-Synthese der Riesenchromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an Chironomus tentans.
Chromosoma, 15, 71-122

Pinto, E.
A. Gómez-Puyou
F. Sandoval
E. Chávez
M. Tuena (1970) : The action of cations and anions on the respiration and ATPase activity of submitochondrial particles
Biochim. Biophys. Acta 223, 436-438

Pressman, B.C.
E. J. Harris
W. S. Jagger
J. H. Johnson (1967) : Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers.
Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 1949

Rechsteiner, M. (1970): Drosophila lactate dehydrogenase and a-glycerophosphate dehydrogenase: Distribution and change in activity during development.
J. Insect Physiol. 16, 1179-1192

Rensing, L. (1969) : Circadiane Rhythmik von Drosophila-Speicheldrüsen in vivo, in vitro und nach Ecdysonzugabe.
J. Insect Physiol. 15, 2285-2303

Rensing, L.
R. Hardeland (1972) : Effects of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on membrane potential, nuclear volume, and puff size in Drosophila salivary gland in vitro.
Exp. Cell Res. 73, 311-318

Rensing, L. (1973) : Effects of 2,4-Dinitrophenol and dinactin on heat-sensitive and ecdysone-specific puffs of Drosophila salivary gland chromosomes in vitro.
Cell Diff. 2, 221-228

Rensing, L.
M. Fischer (1975) : The effects of sodium, potassium and ATP on a developmental puff sequence in Drosophila salivary gland in vitro.
Cell Diff. 4, 209-217

Rensing,L.
J.Behnel (1976) : Control of respiration-dependent puffs in Drosophila salivary glands.
J. Cell Biol. 70, 365

Ritossa, F. (1962) : A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila.
Experimentia 18, 571-573

Ritossa, F. (1963) : New puffs induced by temperatur shock, DNP and salicylate in salivary chromosomes of Drosophila melanogaster.
Dros.Inf.Service 37, 122

Ritossa,F. (1964) : Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of Drosophila.
Exp. Cell Res. 35, 601-607

Rottenberg,H. (1973): The mechanism of energy-dependent ion transport in mitochondria.
J.Membrane Biol. 11, 117-137

Schoon,H.
L.Rensing (1973) : The effects of protein synthesis-inhibiting antibiotics on the puffing pattern of Drosophila salivary gland chromosomes in vitro.
Cell Diff. 2, 97-106

Seecof, R.L.
W.D. Kaplan
D.G. Futch (1969) : Dosage compensation for enzyme activities in Drosophila melanogaster.
Proc.Nat.Acad.Sci. 62, 528-535

Shaw, P.D. (1967) : Oligomycin complex, Rutamycin and Aurovertin.
In: Antibiotics I, Mechanism of Action
Springer-Verlag (Berlin,Heidelberg, New York 1967)

Simon, W.
L.A.R. Pioda
H.-K. Wipf (1969) : Cation specificity of inhibitors.
In: Inhibitors-Tools in Cell Research
Springer-Verlag (Heidelberg, New York)

Slater, E.C.
H.F. TerWelle (1969): Applications of Oligomycin and related inhibitors in bioenergetics.
In: Inhibitors-Tools in Cell Research.
Springer-Verlag (Heidelberg, New York)

Stein, G.S.
J.S. Stein
L.J.Keinsmith (1975): Chromosomal proteins and gene regulation.
Scientific Americ.

Trippa, G.
C.Santolamazza
C.Scozzari (1970): Phosphoglucomutase (Pgm) locus in Drosophila melanogaster: Linkage and population data.
Biochem.Genet. 4, 665-667

Wallis, B.B.
A.S. Fox (1968): Genetic and developmental relationship between two alkaline phosphatases in Drosophila melanogaster.
Biochem,Genet. 2, 141-158

Whitfield,J.F.
A.D. Perris (1968) : The radiometiv action of Valinomycin on the nuclear structure of rat thymocytes.
Exp.Cell Res. 51, 451-461

Young, W.J. (1966) : X-linked electrophoretic variation in 6-phosphogluconate dehydrogenase in Drosophila melanogaster.
J.Hered. 57, 58-60

Zhimulev, I.F.(1974): Comparative study of the function of polytene chromosomes in laboratory stocks of Drosophila melanogaster and the $l_{(3)}$tl mutant.
I. Analysis of puffing patterns in autosomes of the labory stock Batumi-L.
Chromosoma 46, 59-76

Zhimulev, I.F.
F.S. Belyeava (1975): ^{3}H-uridine labelling patterns in the Drosophila melanogaster salivary gland chromosomes X, 2R, and 3L.
Chromosoma 49, 219-231

Ich danke besonders Herrn Professor Dr. L. Rensing für Anregung und sein Interesse an den behandelten Problemen.

Ebenso gilt mein Dank der Kommission für Graduiertenförderung an der Universität Göttingen für die Erteilung eines Stipendiums, sowie dem dortigen Direktor des Zoologischen Instituts, Herrn Professor Dr. G. Birukow, und der Universität Bremen für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen und technischen Hilfsmittel, die mir die Durchführung dieser Dissertation ermöglichten.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Institutsmitarbeiterin, Frau M. Fischer für ihre freundliche und wertvolle technische Hilfe.

Lebenslauf

Am 13. Dezember 1946 wurde ich als zweiter Sohn des Studienrats Wilhelm Behnel und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Wehrmann, in Hameln geboren.

Ich verlebte dort meine ersten sechs Lebensjahre und wurde nach einem Wohnungswechsel in die Stadt Hildesheim im April 1953 in die dortige Gemeinschaftsschule am Moritzberg eingeschult.
In dem Zeitraum von April 1957 bis März 1961 besuchte ich ebenfalls dort nach bestandener Aufnahmeprüfung das humanistische Gymnasium Andreanum und wechselte zu Beginn des Schuljahres 1961/62 aufgrund eines erneuten Wohnwechsels meiner Eltern über auf das neusprachliche und naturwissenschaftliche Gymnasium Martino-Katharineum in Braunschweig, wo ich im September 1966 die Reifeprüfung bestand.
Zur pflichtgemäßen Ableistung meines Wehrdienstes meldete ich mich im Oktober 1966 freiwillig in den Dienst des Bundesgrenzschutz, aus dem ich im März 1968 um meine Entlassung bat zum Zweck des Beginnes meines Studiums.
Im Sommersemester 1968 begann ich das Studium der Biologie an der Universität Göttingen, wo ich im August 1970 die Diplom-Biologen-Vorprüfung und im Februar 1973 die Diplom-Biologen-Hauptprüfung ablegte.

Meine Diplomarbeit fertigte ich in der Zeit von März bis Dezember 1973 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Rensing am Zoologischen Institut der Universität Göttingen an und erhielt am 2. Januar 1974 den akademischen Grad eines Diplom-Biologen.

Anschließend begann ich mit Unterstützung der Bundes-Graduiertenförderung die vorliegende Arbeit ebenfalls unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Rensing, dem ich nach seinem Ruf an die Universität Bremen im April 1976 folgte, wo ich diese Arbeit auch zu Ende führte.